

Rita Diogo de Almeida Calado

**Diversidade genética do vírus da Hepatite C
circulante numa população de utilizadores de
drogas injectáveis de Lisboa**

LISBOA

2009

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

Rita Diogo de Almeida Calado

**Diversidade genética do vírus da Hepatite C
circulante numa população de utilizadores de
drogas injectáveis de Lisboa**

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre
em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

Orientador:
Prof^ª. Doutora Aida Esteves
(IHMT/UNL)

LISBOA

2009

Publicações no âmbito deste trabalho:

Calado, R.D.A., Rocha, M., Parreira, R., Piedade, J., Esteves, A. 2009. “*Molecular epidemiology of HCV infection in injecting drug users in Lisbon, Portugal*” (manuscrito em preparação para publicação em revista internacional).

Calado, R.D.A., Parreira, R., Piedade, J., Esteves, A. “*High prevalence of hepatitis C virus genotype 4 among intravenous drug users in Lisbon*”, (aceite para apresentação no Congresso Nacional *MicroBiotec09*, 28 a 30 de Novembro 2009, Vilamoura, Algarve).

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Aida Esteves (IHMT/UNL), pelos seus valiosos ensinamentos, constante dedicação, paciência, motivação e disponibilidade.

Ao Professor Doutor João Piedade (IHMT/UNL) por estar sempre pronto a prestar a sua ajuda e ensinamento.

Ao Professor Doutor Ricardo Parreira (IHMT/UNL) por todo o apoio e ensinamento dado ao longo de todo o trabalho.

Ao professor Doutor Álvaro Fonseca (FCT/UNL) pela sua disponibilidade e esclarecimentos ao longo da escrita da dissertação.

A todos os colegas e funcionários da Unidade de Virologia do IHMT, em especial à Teresa e Susana, pela sua ajuda e disponibilidade.

Ao Centro de Atendimento a Toxicodependentes das Taipas (CAT-Taipas) e a todo o pessoal envolvido, nomeadamente, Doutor Luís Patrício e Doutor Miguel Vasconcelos pela adesão ao projecto e disponibilização de todas as condições inerentes à colheita das amostras, e Conceição Salavessa e Ania Balça pela colheita das amostras de sangue e dos dados epidemiológicos.

A todos os meus amigos que directa ou indirectamente contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

À Raquel, MT e Daniela pela constante entajuda e cumplicidade ao longo de todos estes anos de formação académica.

À minha família por todo o amor incondicional e apoio prestado em tudo o que faço.

Ao meu tio, sem o qual nada do que sou hoje teria sido possível.

À minha prima Marta

Resumo

A nível mundial, o VHC (Vírus da Hepatite C) afecta cerca de 170 milhões de pessoas sendo uma das principais causas de cirrose e carcinoma hepatocelular. Nos países desenvolvidos, a partilha de equipamento de injeção por Utilizadores de Drogas Injectáveis (UDIs) constitui o principal modo de transmissão do VHC. Estudos recentes demonstraram uma elevada prevalência do VHC nos UDIs da Europa Ocidental. Em Portugal, a epidemiologia da infecção por VHC é largamente desconhecida, sobretudo no que respeita à distribuição dos genótipos e subtipos circulantes. Até à data, apenas cinco sequências portuguesas estão disponíveis nas bases de dados internacionais.

Entre Março de 2008 e Fevereiro de 2009, foram colhidas e testadas para a presença de anticorpos anti-VHC 135 amostras de sangue provenientes de UDIs do Centro de Atendimento a Toxicodependentes das Taipas em Lisboa. Para detectar a presença de infecção activa, as amostras seropositivas para VHC foram sujeitas à extracção de RNA viral e posterior amplificação, por RT-PCR, da região 5'UTR. Sequências parciais das regiões codificantes C/E1 e NS5B foram amplificadas, sequenciadas e analisadas filogeneticamente para todas amostras com infecção activa.

A presença de anticorpos anti-VHC foi detectada em 82 (60,7%) indivíduos. Em 67 (81,7%) indivíduos seropositivos foi detectada a presença de RNA viral e obtidas as sequências nucleotídicas das regiões C/E1 e NS5B. A análise filogenética baseada nestas regiões subgenómicas mostrou que as estirpes do VHC estudadas pertencem aos subtipos 1a (49,2%), 1b (6,0%), 3a (22,4%), 4a (13,4%) e 4d (9,0%), não tendo sido detectados vírus recombinantes. A predominância dos subtipos 1a e 3a, previamente descrita para os UDIs europeus, foi confirmada neste estudo. Por outro lado, a recente introdução e a disseminação do genótipo 4, sugeridas pelas baixas distâncias genéticas entre estirpes virais e a elevada prevalência (22,4%) observadas, tem sido igualmente reportado entre UDIs de alguns países do Sul da Europa. O elevado número de casos de infecção por VHC em UDIs, a elevada prevalência combinada dos genótipos 1 e 4 (77,6%) e o insucesso da resposta destes genótipos aos fármacos disponíveis, colocam Portugal perante um grave cenário de saúde pública. Torna-se assim urgente a realização de mais estudos de epidemiologia molecular de carácter abrangente para uma melhor avaliação e controlo da epidemia por VHC em Portugal.

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) affects 170 million people worldwide and has become a major cause of cirrhosis and liver cancer. Transmission of HCV is primarily parenteral and injection drug use is the predominant mode of transmission in the developed world. Although recent studies suggest a high prevalence of HCV in Western Europe Injection Drug Users (IDUs) data concerning genotype and subtype distribution in our country is scarce, with only five portuguese HCV sequences published in international data bases.

Our goal was to characterize the epidemiology of HCV infection, including estimation of prevalence, genotype distribution and detection of recombinant viruses in IDUs from Lisbon.

During a year, blood samples from 135 attendees of a drug treatment centre (TAIPAS, Lisbon) reporting a history of injection drug use were collected and tested for the presence of HCV antibodies. To detect active HCV infection, viral RNA was subjected to RT-PCR amplification of the 5'UTR. Amplification of the C/E1 and NS5B coding regions and subsequent phylogenetic analysis were performed in all samples with detectable viral RNA.

A total of 82 (60.7%) individuals were positive for HCV antibodies (mean age 40.0 years, 76.8% male). In 67 (81.7%), the presence of viral RNA was detected and amplicons for the C/E1 and NS5B regions were successfully obtained. Phylogenetic analysis based on these two regions showed that the HCV strains belonged to subtypes 1a (49.2%), 1b (6.0%), 3a (22.4%), 4a (13.4%), and 4d (9.0%). No HCV recombinants were found. The predominance of subtypes 1a and 3a among IDUs has been widely described in Europe, and is also verified in this study. Data also showed that 22.4% of the IDUs were infected with HCV genotype 4, which is concordant with the epidemiologic pattern recently reported for several Southern European countries, in association with drug consumption.

The fact that HCV genotype is one of the most important factors affecting the response to antiviral treatment, and that genotypes 1 and 4, with a high rate found in this study (77,6%), present the lowest rates of sustained virological response to current therapy, emphasizes the need for molecular epidemiology studies, targeting not only specific groups but also the general population. This will allow a better evaluation of the burden of hepatitis C in Portugal.

Índice Geral

1. Introdução

1.1	Vírus da Hepatite C	1
1.1.1	Estrutura do virião	1
1.1.2	Organização genómica	2
1.1.3	Ciclo Replicativo	3
1.2	Hepatite C	4
1.2.1	Apresentação clínica	4
1.2.2	Transmissão e factores de risco	5
1.2.3	Diagnóstico Laboratorial	6
1.2.4	Terapêutica	7
1.2.5	Prevenção	8
1.2.6	Distribuição e Prevalência	9
1.3	Diversidade Genética do VHC	10
1.3.1	Genótipos, subtipos e <i>quasispecies</i>	10
1.3.2	Prevalência, distribuição geográfica e origem dos genótipos/subtipos do VHC	12
1.3.3	Genotipagem/subtipagem do VHC e Epidemiologia molecular	14

2. Materiais e Métodos

2.1	Caracterização da população estudada	17
2.2	Preparação das amostras biológicas	17
2.3	Síntese de cDNA	18
2.4	Amplificação por PCR das regiões genómicas 5'UTR, C/E1 e NS5B	18
2.4.1	Desenho e preparação dos <i>primers</i>	19
2.4.2	Amplificação das regiões 5'UTR, C/E1 e NS5B por PCR e/ou <i>heminested</i> -PCR	19
2.4.3	Visualização dos produtos de PCR	22
2.4.4	Purificação dos produtos de PCR	22
2.4.5	Clonagem de produtos de PCR no vector pGEM®-T Easy	23
2.5	Sequenciação de DNA	25
2.6	Análise bioinformática das sequências obtidas	25

2.6.1	Análise e correcção das sequências nucleotídicas e proteicas	25
2.6.2	Análise filogenética	26
2.7	Análise estatística	27
2.8	Números de acesso das sequências nucleotídicas	28
3.	Resultados	
3.1	Características da população estudada	29
3.2	Prevalência de anticorpos anti-VHC	30
3.3	Prevalência de infecção activa	31
3.4	Amplificação dos fragmentos correspondentes às regiões 5'UTR, C/E1 e NS5B	33
3.4.1	Desenho dos <i>primers</i>	33
3.4.2	Amplificação das regiões 5'UTR, C/E1 e NS5B por RT-PCR	33
	a) Detecção de infecção activa: Amplificação da região 5'UTR	33
	b) Amplificação da região NS5B e C/E1 por RT-PCR	34
3.5	Análise filogenética	35
3.5.1	Construção de árvores filogenéticas	35
3.5.2	Subtipos do VHC circulantes em UDIs	37
3.5.3	Distâncias genéticas	46
3.6	Subtipos do VHC e co-infecção com VIH-1	46
3.7	Características epidemiológicas e subtipos do VHC	47
4.	Discussão e Conclusões	49
5.	Referências bibliográficas	61
	Anexos	75

Lista de Abreviaturas

A, C, G, T – Adenina, Citosina, Guanina, Timina ; Bases orgânicas constituintes dos nucleótidos

ALT – Alanina Aminotransferase

anti-VHC – anticorpo anti-VHC

BLAST – do inglês, Basic Local Alignment Search Tool

BSA – Albumina de soro bovino, do inglês Bovine Serum Albumin

°C – graus Celsius

CAT – Centro de Atendimento a Toxicodependentes

cDNA – DNA complementar

CN – Controlo negativo

C – Proteína do *core*, do inglês core protein

CD81 – receptor celular, do inglês Cluster of Differentiation 81

d – Distância genética

ddH₂O – Água destilada desionizada

DEPC – Dietilpirocarbonato

DNA – Ácido Desoxirribonucleico, do inglês Deoxyribonucleic Acid

dNTP – Desoxirribonucleótidos 5'-trifosfatados

DO – Densidade Óptica

DP – Desvio Padrão

DTT – Ditioneitol

E1 – Proteína do invólucro 1 (“*envelope*”) do Vírus da Hepatite C

E2 – Proteína do invólucro 2 (“*envelope*”) do Vírus da Hepatite C

E. coli – *Escherichia coli*

ELISA – do inglês, Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

f – usado para designar o *primer forward*

g – grama

HCC – Carcinoma Hepatocelular, do inglês Hepatocellular Carcinoma

HCl – Ácido clorídrico

hN-PCR – *heminested*-PCR

i – usado para designar o *primer interno*, do inglês *inner*

IFN – Interferão

IPTG – isopropil-β-D- tiogalactopiranosídeo (C₉H₁₈O₅S)

IRES – Local interno de entrada no ribossoma, do inglês Internal Ribosome Entry Site

k(p)b – Kilo (pares) de bases = 10³ (pares) de bases

KCl – Cloreto de potássio

KOAc – Acetato de Potássio

l – Litro

LB – Meio de Luria-Bertani

log – logaritmo

m – Mili, prefixo que designa 10^{-3}

M – Molaridade

MAFFT – do inglês, *Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*

Mc – Marcador de tamanho molecular

MEGA – do inglês, *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

mM – Milimolar

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro, do inglês *Messenger Ribonucleic Acid*

min – minutos

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

Mol – mole, Unidades SI para quantidade de uma substância

n – nano, prefixo no SI de unidades denotando um fator de 10^{-9}

NaCl – Cloreto de sódio

nm – nanómetro, equivalente a $1,0 \times 10^{-9}$ metros

nM – nanomolar

NS – Não Estrutural, do inglês *Non Structural*

NS5B – Proteína viral não estrutural 5B do Vírus da Hepatite C

nt – nucleótido

Número xg – força centrífuga

o – usado para designar o *primer* externo, do inglês *outer*

ORF – grelha de leitura, do inglês, *Opening Reading Frame*

P – valor de *P*, nível de significância observado

Países:

AFs – África do Sul

AG – Angola

AL – Alemanha

AS – Austrália

BR – Brasil

CH – China

CM – Camarões

CV – Cabo Verde

EE – Estónia

EG – Egipto

EL – Eslovénia

ES – Espanha

FR – França

HK – Hong Kong

ID – Indonésia

IN – Índia

IR – Irlanda

JP – Japão

MC – Moçambique

MD – Moldávia

NA – Norte de África

NZ – Nova Zelândia

PT – Portugal

RU – Rússia

SU – Suíça

SK – Coreia do Sul

TK – Turquia
EUA – Estados Unidos da América
VT – Vietname
Pb – par de bases
PCR – Reacção em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*
PEG – Polietilenoglicol, do inglês *polyethylene glycol*
pH – Potencial Hidrogeniónico de uma solução
PJ – Período Janela
pKS – *pBluescript* KS II
Pmol – Picomole = 10^{-12} moles
Primer – Cadeia de ácidos nucleicos iniciadora da replicação
R – usado para designar o *primer reverse*
RE – Retículo Endoplasmático
RdRp – *RNA Dependent RNA Polimerase*
RBV – Ribavirina
RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphisms*
RNA – ácido ribonucleico, do inglês *Ribonucleic Acid*
rpm – rotações por minuto
RT – Transcrição Reversa, do inglês *Reverse Transcription*
SDS – Dodecilsulfato de sódio, do inglês *Sodium Dodecyl Sulphate*
seg – segundos
SR-BI – receptor celular, do inglês *class B Scavenger Receptor type I*
TAE – Tris-Acetato-EDTA
TE – Tris-EDTA
Tm – Temperatura de fusão, do inglês *melting Temperature*
TMA – Amplificação mediada por transcrição, do inglês *Transcription-mediated Amplification*
Tris – Tris (hidroximetil) aminometano
Tris-HCl – Tris Hidroclorato
TSS – do inglês, *Transformation Storage Solution*
U – Unidade
UI – Unidade Internacional
UDI – Utilizador de Drogas Injectáveis, do inglês *Injecting Drug User*
UTR – região não traduzida, do inglês *Untranslated Region*
UV – Ultravioleta
V – Volt, Unidade SI de voltagem eléctrica
VHC – Vírus da Hepatite C
VHG-B – Vírus da Hepatite G – tipo B
VIH-1 – Vírus da Imunodeficiência humana, tipo 1
xGal – 5-bromo-4-cloro-3-indolol- β -D-galactopiranósido
 μ – Micro, prefixo que designa 10^{-6}

1. Introdução

A infecção com o vírus da Hepatite C (VHC) afecta aproximadamente 3% da população mundial (WHO, 1997) e constitui uma das principais causas de hepatite crónica, cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC), não existindo até à data uma vacina eficaz (Simmonds *et al.*, 2005).

O VHC, identificado pela primeira vez em 1989 (Choo *et al.*, 1989), caracteriza-se por extensa diversidade genética, possuindo pelo menos 6 genótipos e mais de 80 subtipos, dos quais 20 estão completamente sequenciados (<http://hcv.lanl.gov/content/sequence/HCV/classification/genotable.html>). O VHC pertence à família *Flaviviridae*, é o único membro do género *Hepacivirus* (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>) e tem apenas como hospedeiro natural o homem (Pybus *et al.*, 2009). O genoma do VHC consiste numa molécula de RNA de cadeia simples e polaridade positiva, com aproximadamente 9,6 kb, que constitui uma única grelha de leitura (ORF, *Open Reading Frame*). A ORF codifica uma poliproteína de aproximadamente 3000 resíduos de aminoácidos que é posteriormente hidrolisada, por proteases virais e celulares, nas diferentes proteínas virais individuais.

A transmissão do VHC é feita essencialmente por via parentérica, sendo a partilha de material de injeção por utilizadores de drogas injectáveis (UDIs), o factor de risco actualmente mais comum em países desenvolvidos (Aceijas e Rhodes, 2007). Em Portugal, estima-se que este grupo de risco apresente uma seroprevalência para VHC superior a 90% (Aceijas e Rhodes, 2007). A identificação dos genótipos e subtipos do VHC constitui uma ferramenta extremamente importante a nível clínico, bem como nos estudos de epidemiologia molecular (Murphy *et al.*, 2007).

1.1 O Vírus da Hepatite C (VHC)

1.1.1 Estrutura do virião

Os viriões do VHC são partículas esféricas, com um diâmetro entre os 55 e 65 nm, revestidas externamente por um invólucro lipídico de origem celular, no qual estão ancoradas

as glicoproteínas virais E1 e E2. No interior, a nucleocápside constituída pela proteína do *core* (C) protege o RNA genómico viral (revisto em Lindenbach e Rice, 2005).

1.1.2 Organização genómica

O VHC possui um genoma de RNA, de cadeia simples e polaridade positiva, com um comprimento aproximado de 9,6 kb. A maioria do genoma forma uma única ORF, a qual codifica uma poliproteína precursora de aproximadamente 3000 resíduos de aminoácidos, flanqueada em ambas as extremidades por pequenas regiões não traduzidas e com extensa estrutura secundária denominadas 5'UTR e 3'UTR (figura 1.1) (Choo *et al.*, 1989). A região 5'UTR (~341 nucleótidos) possui um local interno de entrada no ribossoma (IRES- *internal ribosomal entry site*) responsável pela iniciação da tradução da poliproteína viral (revisto em Griffin *et al.*, 2008).

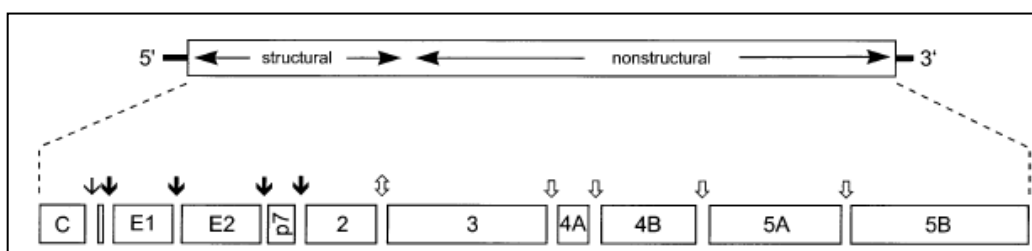


Figura 1.1 – Organização do genoma do VHC e produtos resultantes da clivagem da poliproteína. Representação esquemática indicando as posições das proteínas estruturais e não estruturais da poliproteína e as regiões não traduzidas 5'UTR e 3'UTR. Os produtos do processamento da poliproteína estão representados abaixo. Indicação do local de clivagem para as peptidases de sinal (↴), protease NS2-3 (⊕), protease NS3-4A (⊕), e proteases celulares desconhecidas (↴) (Bartenschlager e Lohmann, 2000).

A poliproteína é hidrolizada por proteases celulares e virais em, pelo menos, 10 proteínas diferentes estruturais (C, E1, E2) e não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (revisto em Bartenschlager e Lohmann, 2000). Entre os elementos estruturais e não estruturais, existe ainda uma pequena proteína de membrana (proteína p7) que parece funcionar como canal iónico (viroporina) (Pavlovic *et al.*, 2003). Actualmente a sua classificação é controversa, não havendo um consenso quanto à sua presença no virião (Moradpour *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2007; Griffin *et al.*, 2008). Como resultado de um evento de *frameshift* na região do *core*, é ainda produzida a proteína F não essencial para a

replicação viral e de função desconhecida. No entanto, a detecção de anticorpos específicos em indivíduos infectados indica que é produzida *in vivo* (Vassilaki e Mavromara, 2009; Yuksek *et al.*, 2009).

Para além do seu papel estrutural, as glicoproteínas E1 e E2 são essenciais para a entrada do vírus na célula hospedeira, enquanto que a proteína C está envolvida nos mecanismos de montagem do vírus e secreção das partículas infecciosas (revisto em Pawlotsky *et al.*, 2007). As proteínas não estruturais catalisam, em parte, o processamento da poliproteína (NS2-3 e NS3-4A) e são responsáveis pela síntese do RNA viral (NS4B, NS5A, NS5B (revisto em Griffin *et al.*, 2008). NS5B possui actividade de polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp) (revisto em Dubuisson, 2007).

1.1.3 Ciclo replicativo

O VHC infecta apenas o Homem e chimpanzés. Os hepatócitos são as principais células-alvo, mas tem sido igualmente descrita a infecção de células do sistema imune, *e.g.* linfócitos, monócitos e células dendríticas (revisto em MacParland *et al.*, 2009). O primeiro passo do ciclo replicativo consiste na ligação do virião à célula hospedeira através da interacção entre a glicoproteína E2 e receptores da superfície celular (revisto em Bartenschlager e Lohmann, 2000). Várias moléculas têm sido apontadas como receptores putativos do VHC incluindo, *inter alia*, as moléculas CD81 e SR-BI (revisto em Sabahi, 2009). A internalização das partículas virais depende de endocitose mediada por clatrina (Blanchard *et al.*, 2006) e a nucleocápside é libertada para o citoplasma celular como resultado da fusão entre as membranas viral e celular, mediada por E1 e induzida pelo pH ácido do endossoma (revisto em Pawlotsky *et al.*, 2007). A descapsidação, um processo ainda pouco conhecido, liberta no citoplasma o RNA genómico viral. Este é directamente traduzido por um processo independente de *cap*, através da ligação directa do IRES à subunidade ribossomal 40S, sem que sejam necessários factores canónicos de iniciação de tradução (revisto em Lindenbach e Rice, 2005). A poliproteína é traduzida e processada em associação com o Retículo Endoplasmático (RE) produzindo as 10 proteínas virais. As junções C/E1, E1/E2, E2/p7 e p7/NS2 são clivadas por peptidases celulares enquanto que as junções NS2/NS3 e NS3/NS5B são clivadas por duas proteases virais: NS2-3 e NS3-4A, respectivamente (figura 1.1) (revisto em Dubuisson, 2007).

Finda a tradução, tem início o processo de replicação do RNA genómico. A síntese do genoma do VHC é efectuada em complexos de replicação ainda mal caracterizados, constituídos por NS5B, outras proteínas virais e factores celulares, em associação com membranas intracelulares. NS4B induz a formação de uma teia membranar característica, aparentemente derivada do RE e/ou aparelho de Golgi (Egger *et al.*, 2002). À semelhança da maioria dos vírus de RNA de polaridade positiva, a replicação do genoma do VHC tem início com a síntese de uma cadeia de polaridade negativa (intermediário de replicação) complementar do RNA genómico. Subsequentemente, a cadeia recém-sintetizada serve de molde à síntese de inúmeras novas cadeias de polaridade positiva que, por sua vez, podem ser usadas na síntese de novos intermediários replicativos, na expressão da poliproteína ou na montagem de novas partículas virais (revisto em Bartenschlager e Lohmann, 2000).

As fases finais do ciclo replicativo incluem a montagem do virião e a saída das partículas virais da célula. Devido à falta de modelos de estudo apropriados, estas fases permanecem ainda pouco conhecidas (Pawlotsky *et al.*, 2007). A formação da nucleocápside envolve a oligomerização da proteína C e encapsidação do RNA genómico. Este processo, mediado pela interacção entre a proteína C e o RNA viral, parece ser crítico para a paragem da replicação do genoma e início da sua encapsidação. A nucleocápside adquire um invólucro por gemulação através das membranas intracelulares do RE, sendo a morfologia do virião aparentemente determinada por interacções entre as proteínas da nucleocápside e E1/E2 (revisto em Pawlotsky *et al.*, 2007; revisto em Suzuki *et al.*, 2007). Finalmente, as partículas do VHC saem da célula hospedeira pela via secretória (revisto em Suzuki *et al.*, 2007).

1.2 Hepatite C

1.2.1 Apresentação clínica

Em termos clínicos, a Hepatite C manifesta-se de duas formas: aguda e crónica. Por convenção, a **forma aguda** da doença diz respeito à presença de sinais clínicos ou sintomas de hepatite até um período de 6 meses após o presumível tempo de exposição ao VHC (revisto em Blackard *et al.*, 2008). No entanto, a doença na forma aguda surge em apenas 20 a 30% dos indivíduos infectados (revisto em Augusto e Lobato, 2003). Nos restantes a infecção é subclínica ou assintomática, pelo que estes indivíduos representam um problema de saúde pública ao poderem transmitir o vírus sem o saberem (revisto em Ferreira e Gameiro, 2002;

revisto em Blackard *et al.*, 2008). Apesar da infecção aguda ser ligeira ou inaparente, a resolução espontânea da virémia verifica-se em apenas cerca de 20% dos casos e parece ocorrer com maior probabilidade em indivíduos jovens, do género feminino, caucasianos e/ou com baixos níveis de virémia (Thomas *et al.*, 2000; revisto em Lauer e Walker, 2001; revisto em Chen e Morgan, 2006; revisto em Blackard *et al.*, 2008).

Nos indivíduos com infecção aguda não resolvida, *i.e* 70-80%, observa-se evolução para a **forma crónica**, em que ocorre replicação viral persistente com detecção de RNA viral no soro ou tecido hepático, na presença de resposta imune (Figura 1.2) (revisto em Blackard *et al.*, 2008). Uma vez a cronicidade estabelecida, não existe resolução espontânea da virémia (revisto em Lemon *et al.*, 2007). Os indivíduos cronicamente infectados podem durante muito tempo apresentar fadiga como único sintoma e só tardiamente surge doença hepática. Aproximadamente 15 a 20% dos doentes infectados com VHC desenvolvem cirrose num período de 10 a 30 anos e, por ano, 1-5% destes doentes desenvolve HCC (revisto em de Bruijne *et al.*, 2009).

Comparativamente com os indivíduos mono-infectados com VHC, os indivíduos co-infectados com VIH têm menor probabilidade de eliminar a virémia na sequência da fase aguda (Thomas *et al.*, 2000), possuem cargas virais mais elevadas (Matthews-Greer *et al.*, 2001) e apresentam uma progressão mais rápida da doença hepática associada ao VHC (revisto em Lauer e Walker, 2001).

1.2.2 Transmissão e factores de risco

O VHC é transmitido eficazmente por via parentérica, através de exposição percutânea directa, longa ou repetida, a sangue infectado ou seus derivados (Ferreira e Gameiro, 2002; revisto em Lemon *et al.*, 2007). Os factores de risco associados à transmissão do VHC incluem transplante de órgãos de um dador infectado (revisto em Chen e Morgan, 2006), transfusões sanguíneas anteriores a 1992 (risco praticamente nulo em países desenvolvidos desde a implementação sistemática de testes de rastreio a partir de então) (revisto em Chen e Morgan, 2006) e consumo de drogas injectáveis (Mathei *et al.*, 2002; Aceijas e Rhodes, 2007; revisto em Lavanchy, 2009). O risco de transmissão é menor quando da exposição percutânea a um inóculo baixo, *e.g.* transmissão ocupacional a picada acidental (1-2%) (revisto em Lemon *et al.*, 2007), ou por exposição de mucosas a sangue infectado, *e.g.* transmissão perinatal (4-7%) (revisto em Lemon *et al.*, 2007), actividade sexual de risco (0-3%) (revisto

em Cavalheiro, 2007). A transmissão iatrogénica devido à manipulação de material médico contaminado é responsável por 2,3-4,7 milhões de novas infecções anuais nos países em desenvolvimento e de economias de transição (revisto em Lavanchy, 2009). Estudos recentes têm vindo a descrever prevalências cada vez mais elevadas associadas a transmissão intrafamiliar na ausência de risco de exposição parentérica ao vírus (de Waure *et al.*, 2009). Também o uso de cocaína por via nasal tem sido relatado como possível modo de transmissão do VHC (Scheinmann *et al.*, 2007).

Actualmente, a partilha de material de injeção associada aos UDIs constitui o principal modo de transmissão do VHC em países desenvolvidos, nomeadamente, Europa Ocidental e EUA, sendo igualmente um fenómeno em crescimento nos países em desenvolvimento (~40% das infecções) (revisto em Lavanchy, 2009). Por outro lado, ainda que a eficiência de transmissão parentérica do VHC seja bastante superior à do VIH (revisto em Lauer e Walker, 2001), devido ao modo de transmissão comum, uma grande proporção de utilizadores de drogas injectáveis infectada com o VHC, está também infectada com o VIH (revisto em Rockstroh e Spengler, 2004).

1.2.3 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial, importante para a gestão da infecção por VHC, baseia-se em **ensaios serológicos** (detecção de anticorpos anti-VHC) e **virológicos** (detecção e quantificação de RNA do VHC) (revisto em Chevaliez e Pawlotsky, 2006).

Actualmente, a detecção de anticorpos anti-VHC no plasma ou soro é baseada em ensaios imunoenzimáticos de terceira geração que usam antigénios recombinantes de várias proteínas virais na captura de anticorpos específicos e permitem a detecção entre as 4 e as 12 semanas de infecção (revisto em Poynard *et al.*, 2003; revisto em Chevaliez e Pawlotsky, 2006; revisto em Lemon *et al.*, 2007).

Nos testes virológicos, a detecção de RNA viral baseia-se na amplificação da região altamente conservada 5'UTR (Sandres-Sauné *et al.*, 2003; Cantaloube *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2007). No formato qualitativo, estes ensaios usam técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), PCR em tempo real ou TMA (*Transcription-mediated Amplification*) na sequência de uma reacção de transcrição reversa (RT) (revisto em Chevaliez e Pawlotsky, 2006) e permitem determinar a presença do VHC na fase inicial da infecção (1-2 semanas após exposição), antes mesmo da produção de anticorpos (revisto em Ozaras e Tahan, 2009). O

limite inferior destes ensaios é 10-50 UI/ml (revisto em Chevaliez e Pawlotsky, 2006). Existem ainda testes quantitativos, *i.e.* que determinam a carga viral, sendo úteis na previsão e avaliação da resposta ao tratamento e relapso (revisto em Chevaliez e Pawlotsky, 2006).

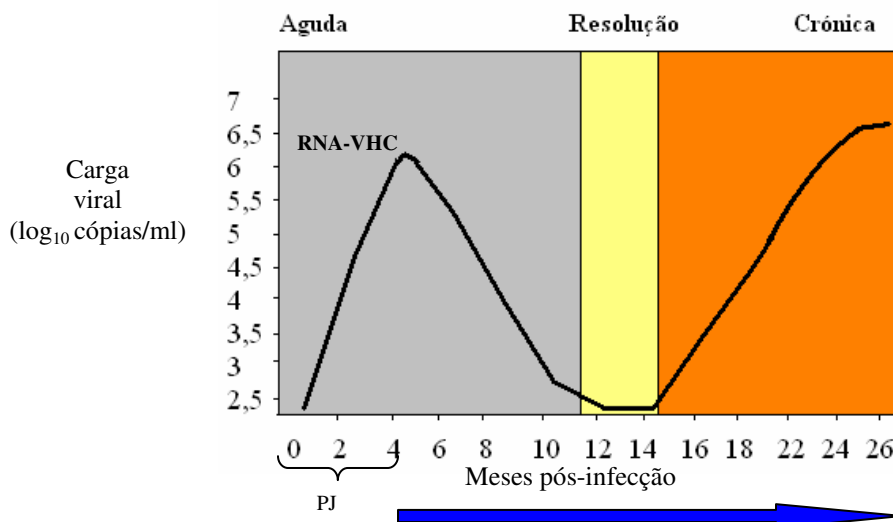


Fig. 1.2 – Representação esquemática da história natural da infecção por VHC e resposta imune humoral. Níveis de RNA do VHC (linha a cheio) e início da produção de anticorpos anti-VHC (seta azul) ao longo da infecção. No eixo dos xx encontram-se representados o tempo (meses) após a infecção por VHC e no eixo dos yy a carga viral (\log_{10} cópias/ml). PJ – Período Janela (adaptado de Blackard *et al.*, 2008).

Os testes serológicos, por si sós, dão informação sobre o contacto prévio com o vírus, não permitindo distinguir entre infecção resolvida e activa (aguda ou crónica) (revisto em Ferreira e Gameiro, 2002; revisto em Lemon *et al.*, 2007). A presença de RNA viral na ausência de anticorpos anti-VHC constitui um forte indicador de infecção aguda, que poderá posteriormente ser confirmada quando da seroconversão (Figura 1.2). No entanto, os indivíduos com infecção aguda podem apresentar no momento do diagnóstico a presença de anticorpos anti-VHC e RNA viral (Figura 1.2), o que, sem informação clínica complementar, dificulta a distinção entre as formas aguda e crónica da doença (revisto em Chevaliez e Pawlotsky, 2006).

1.2.4 Terapêutica

O tratamento da Hepatite C é bastante importante por duas razões: por um lado pode impedir a evolução para doença hepática grave e, por outro, travar a transmissão do vírus. A infecção por VHC é susceptível de tratamento, mas este acarreta custos elevados, requer uma

monitorização a longo prazo e está associado a vários efeitos adversos de difícil tolerância por parte de alguns doentes (revisto em Pawlotsky *et al.*, 2007).

Actualmente, o tratamento disponível para a Hepatite C crónica é baseado numa combinação de Interferão α (IFN $_{\alpha}$) “peguilado” e Ribavirina (RBV) e o seu êxito (resposta virológica sustentada) é avaliado pela ausência de RNA viral, 6 meses após o tratamento (revisto em Pawlotsky *et al.*, 2007; revisto em MacParland *et al.*, 2009; revisto em Sabahi, 2009). O tratamento é eficaz em aproximadamente 80% dos doentes infectados com o genótipo 2 ou 3 e menos de 50% dos doentes com o genótipo 1 (revisto em Pawlotsky *et al.*, 2007). Assim, doentes com o genótipo 1 necessitam de uma maior dose de RBV e tratamento mais prolongado (1,0-1,2 g/dia, 48 semanas) do que doentes infectados com o genótipo 2 ou 3 (0,8 g/dia, 24 semanas). Para os genótipos 4, 5 e 6 existem ainda poucos ensaios clínicos, aplicando-se o protocolo terapêutico utilizado para o genótipo 1 (revisto em Pawlotsky, 2006). Nos indivíduos co-infectados com VIH é utilizada a mesma terapia de combinação, mas existe um risco acrescido de hepatotoxicidade (revisto em Pawlotsky *et al.*, 2007). Os resultados e a tolerância ao tratamento são também inferiores ao dos indivíduos infectados só com VHC (revisto em Poynard *et al.*, 2003).

Considerando que as taxas de resposta à terapia actual são ainda variáveis e, nalguns casos, muito baixas, torna-se urgente o desenvolvimento de novas terapias e vacinas. Recentemente, e à semelhança do VIH, tem havido um esforço para desenvolver novos fármacos baseados na inibição de passos do ciclo replicativo/enzimas específicos (de Bruijne *et al.*, 2009).

1.2.5 Prevenção da transmissão

Considerando a eficácia limitada do tratamento da Hepatite C e o facto de não existir uma vacina disponível contra o VHC, a eliminação dos comportamentos de risco assume um papel muito importante na redução da incidência da infecção e, consequentemente, na diminuição dos casos de doença hepática.

A maioria das infecções por VHC está associada à utilização de drogas injectáveis e, por isso, a prevenção deste comportamento de risco irá eliminar grande parte das infecções. Neste contexto, deverá ser incentivado o uso de material de injeção descartável, bem como desencorajada a partilha do mesmo através de campanhas de sensibilização e informação sobre a transmissão e gravidade da doença junto deste grupo de risco. Apesar dos restantes

factores de risco associados à transmissão do VHC serem actualmente responsáveis por uma pequena fracção das infecções nos países desenvolvidos, devem ser igualmente implementadas medidas de prevenção, nomeadamente, serviços de aconselhamento de redução de riscos e uma revisão e melhoria das práticas de controlo de infecção em todos os sectores de saúde (Shepard *et al.*, 2005; Aceijas e Rhodes, 2007). Para além destas medidas de prevenção primária, deverão ser implementadas medidas de prevenção secundária através da identificação de indivíduos em risco e realização de testes de diagnóstico para a detecção precoce da infecção (Alter, 2002).

1.2.6 Distribuição e Prevalência

Segundo a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 170 milhões de pessoas em todo o mundo (3% da população mundial) estão infectadas com o VHC (WHO, 1997; Lavanchy, 2009).

Relativamente à população em geral, a Austrália, o Canadá e o Norte da Europa apresentam as menores taxas de prevalência de Hepatite C (<1%). Os EUA e a maioria da Europa apresentam uma prevalência de 1%, variando entre 0,2% e 2% na Europa Ocidental. As taxas de prevalência mais elevadas (>2%) são encontradas em muitos países de África, América Latina, Ásia Central e Sudeste Asiático (WHO, 1999; Mathei *et al.*, 2002). As taxas de infecção variam consideravelmente entre diferentes países, *e.g.* 0,3% na Suécia *versus* > 14% Egipto, e, inclusivamente, dentro do mesmo país (Lavanchy, 2008). Em Portugal desconhece-se a verdadeira magnitude do problema, uma vez que existem dados escassos sobre a doença. No entanto, estima-se que cerca de ~1,5% da população portuguesa tenha anticorpos anti-VHC (Marinho *et al.*, 2001).

Comparativamente com a população em geral, a estimativa da prevalência do VHC em UDIs dos países desenvolvidos é bastante elevada (revisto em Aceijas e Rhodes, 2007). Países como os EUA e a Austrália apresentam uma seroprevalência do VHC em UDIs na ordem dos 68% e 80%, respectivamente (revisto em Shepard *et al.*, 2005). Na Europa Ocidental, este grupo de risco possui igualmente uma elevada seroprevalência para VHC (37-98%) com algumas áreas geográficas de Portugal a apresentarem das taxas mais elevadas da Europa (> 90%) (Marinho *et al.*, 2001; Mathei *et al.*, 2002; Aceijas e Rhodes, 2007; EMCCDA, 2008). Em indivíduos infectados com VIH que possuem a utilização de drogas injectáveis como

factor de risco, a prevalência de co-infecção com VHC é bastante elevada, podendo atingir os 90% em alguns países, nomeadamente, Espanha, Suíça, China e Vietname (revisto em Rockstroh e Spengler, 2004; revisto em Alter, 2006; revisto em Shepard *et al.*, 2005; Aceijas e Rhodes, 2007; March *et al.*, 2007). Para Portugal desconhecem-se dados relativos à co-infecção VHC-VIH em UDIs (Aceijas e Rhodes, 2007).

1.3 Diversidade Genética do VHC

1.3.1 Genótipos, subtipos e *quasispecies*

A variabilidade genética do VHC pode ser observada a diferentes níveis. Em primeiro lugar verifica-se uma divergência genética substancial caracterizada pela existência dos diferentes genótipos do VHC, alguns dos quais com distribuição geográfica e vias de transmissão específicas (Simmonds, 2004). Actualmente o VHC é classificado em 6 grupos genéticos principais (genótipos) numerados de 1 a 6, que diferem uns dos outros 30-35% ao nível nucleotídico (Simmonds, 2004). Um estudo recente sugere a descoberta de um novo genótipo putativo, designado por genótipo 7 (Murphy *et al.*, 2007). Por sua vez, cada um destes genótipos possui uma série de subtipos (> 80 no total), designados por letras, que diferem uns dos outros 20-25% ao nível nucleotídico (tabela 1.1) (Simmonds *et al.*, 1994; Kuiken *et al.*, 2008).

Tabela 1.1 – Lista dos genótipos e subtipos do VHC definidos na base de dados do VHC (<http://hcv.lanl.gov/content/sequence/HCV/classification/genotable.html>).

GENÓTIPO	SUBTIPO
1	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m
2	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r
3	a, b, c, d, e, f, g, h, i, k, l
4	a, c, d, e, f, g, h, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u*
5	a
6	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u
7	a

* subtipo 4u retirado de Kamal e Nasser, 2008

Apesar da extensa diversidade genética, todos os genótipos possuem o mesmo arranjo linear de genes, dimensões idênticas das grelhas de leitura e relações filogenéticas geralmente consistentes ao longo de todo o genoma (Simmonds, 2004). Este facto contribuiu para que grande parte da classificação actual das variantes do VHC seja baseada em sequências parciais de regiões subgenómicas como C/E1 ou NS5B (Simmonds *et al.*, 1994).

A variabilidade do VHC encontra-se distribuída ao longo do genoma de forma heterógenea, havendo consistentemente regiões mais variáveis que outras. As regiões das glicoproteínas E1 e E2 concentram a maior variabilidade do genoma divergindo, não só entre diferentes genótipos (50%), como também dentro do mesmo subtipo. Por outro lado, a região codificadora do *core* e algumas regiões não estruturais como, por exemplo, a NS3, são mais conservadas (Simmonds, 1999). O nível mais baixo de variabilidade é encontrado nas extremidades genómicas (5'UTR e 3'UTR), onde são necessárias sequências e estruturas secundárias de RNA específicas para a síntese e tradução do genoma viral. (Simmonds, 1999; Simmonds, 2004)

O VHC possui ainda a capacidade de se diversificar dentro de um indivíduo infectado ao longo do tempo, resultando em *quasispecies*, isto é, uma população de variantes virais distintas mas estreitamente relacionadas, pertencentes a um único indivíduo (Domingo *et al.*, 1998; Simmonds, 2004).

Grande parte da variação genética do VHC é devida à ocorrência de uma elevada taxa de mutações resultante da ausência de actividade de *proofreading* da proteína NS5B (Simmonds, 1999). A síntese do genoma viral caracteriza-se por uma taxa de erro entre 1:10 000 e 1:100 000 bases copiadas que, associada à elevada capacidade replicativa do vírus (10^{12} viriões/dia), contribui para a rápida evolução do VHC (revisto em Timm e Roggendorf, 2007). Interessa ainda referir que muitas das mutações, nomeadamente substituições nucleotídicas, são acumuladas em locais que não alteram a sequência codificante das proteínas do VHC, providenciando um relógio molecular útil para a estimativa do tempo de divergência dos variantes do VHC numa população (Simmonds, 1999).

Embora pouco frequente, a recombinação também contribui para a variabilidade genética do VHC, tendo já sido identificados alguns recombinantes naturais inter-genotípicos (Kalinina *et al.*, 2002; Kageyama *et al.*, 2006; Moreau *et al.*, 2006; Nopporpanth *et al.*, 2006; Legrand-Abravanel *et al.*, 2007), intra-genotípicos (Colina *et al.*, 2004; Ross *et al.*, 2008) e intra-subtipo (Moreno *et al.*, 2006; Sentandreu *et al.*, 2008).

Uma vez que o alvo de actuação das vacinas deverá consistir em regiões altamente conservadas de um agente patogénico, a elevada diversidade genética do VHC representa um forte obstáculo ao desenvolvimento de vacinas eficientes e de novos fármacos.

1.3.2 Prevalência, distribuição geográfica e origem dos genótipos/ subtipos

Os genótipos e subtipos do VHC possuem prevalências e distribuições geográficas diversas e, de um modo genérico, consideram-se dois padrões epidemiologicamente distintos. As estirpes que surgem isoladamente em áreas geográficas restritas são geralmente de um único genótipo com um grande número de subtipos e consequente extensa diversidade genética (Smith *et al.*, 1997). Estas estirpes “endémicas” reflectem baixos níveis de transmissão, a longo prazo, em determinadas populações e representam as populações virais que estão na origem das estirpes epidémicas (Smith *et al.*, 1997; Pybus *et al.*, 2001; Simmonds, 2004). As regiões consideradas potencialmente endémicas são a Costa da Guiné na África Ocidental para o genótipo 1, a África Central para o genótipo 2, o Norte do subcontinente indiano para o genótipo 3, a África Central para o genótipo 4 e o Sudeste Asiático para o genótipo 6. Em relação ao genótipo 5 continua por descobrir uma área endémica, havendo evidências que apontam para a África do Sul (Smith *et al.*, 1997).

Pelo contrário, as estirpes com distribuição global apresentam prevalências elevadas e baixos níveis de variação genética. Geralmente há co-circulação de vários genótipos do VHC, sendo estes representados por um número reduzido de subtipos (Figura 1.3). Este padrão é consistente com introduções relativamente recentes e limitadas do VHC a partir de áreas endémicas (Smith *et al.*, 1997; Pybus *et al.*, 2001; Simmonds, 2004). Estas estirpes “epidémicas” disseminaram-se rapidamente por todo o mundo durante o século XX, como resultado da introdução de determinados factores de risco, nomeadamente, transfusões sanguíneas e partilha de material de injeção entre UDIs (revisto em Smith *et al.*, 1997; Pybus *et al.*, 2001; Simmonds, 2004). Os principais genótipos e subtipos encontrados nos países industrializados (Figura 1.3) incluem: o subtipo 1a distribuído globalmente no Norte da Europa e EUA e fortemente associado a UDIs; o subtipo 1b associado a indivíduos de idade mais avançada e a transfusões sanguíneas no passado; o subtipo 3a distribuído amplamente nos UDIs, particularmente da Europa; os subtipos 2a, 2b e 2c, encontrados nos países mediterrânicos e Extremo Oriente; o subtipo 4a, altamente distribuído em África e no Médio Oriente, associado no Egipto ao tratamento massivo da *Shistosomose*; o subtipo 5a prevalente

na África do Sul; o genótipo 6 encontrado nos UDIs de Hong Kong, Vietname e, mais recentemente, Austrália (Smith *et al.*, 1997; Simmonds, 2004).

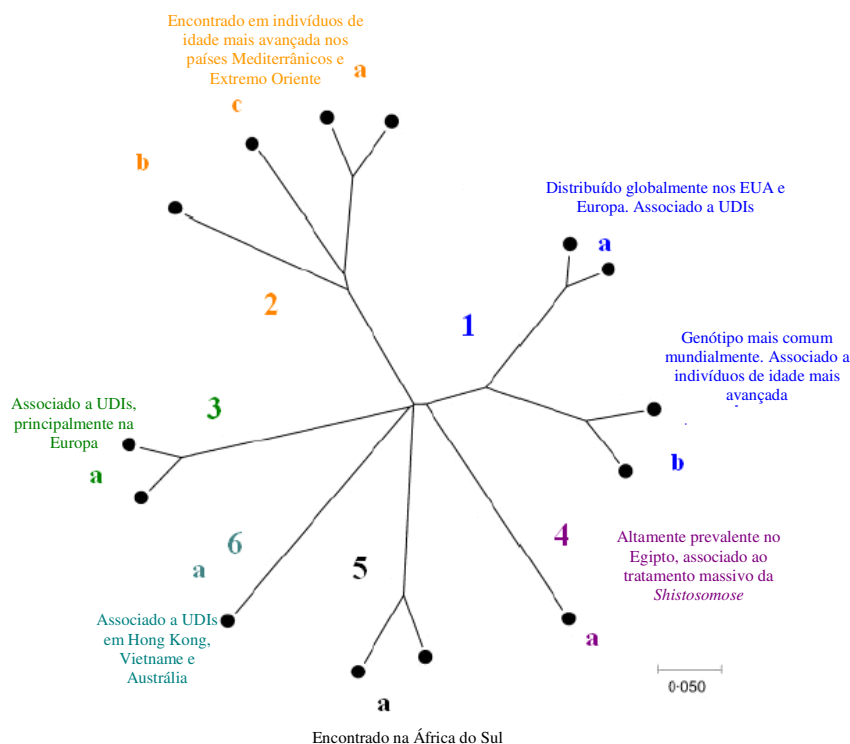


Figura 1.3 – Representação da árvore evolutiva dos principais genótipos do VHC encontrados em países industrializados, e as suas principais associações epidemiológicas com grupos de risco específicos (adaptado de Simmonds, 2004).

Recentemente, tem sido verificada uma crescente disseminação do genótipo 4 (subtipos 4a e 4d) em alguns países do Sul da Europa, associada ao uso de drogas injectáveis, co-infecção VHC-VIH e imigração proveniente do Norte de África (Morice *et al.*, 2001; van Asten *et al.*, 2004; Nicot *et al.*, 2005; Echevarría *et al.*, 2006; Fernández-Arcás *et al.*, 2006; Katsoulidou *et al.*, 2006; Franco *et al.*, 2007; Sereno *et al.*, 2009).

Em relação a Portugal, verifica-se um número muito limitado de dados de distribuição dos genótipos/subtipos do VHC. Os poucos estudos existentes, baseados na população em geral, indicam que em Portugal o genótipo 1 (subtipo 1a e 1b) será o mais frequente (~50%), seguido dos genótipos 3 (~20%) e 4 (<8%), enquanto que os genótipos 2, 5 e 6 são pouco prevalentes (de Carvalho *et al.*, 2000; Ramalho *et al.*, 2000; Gameiro *et al.*, 2001; Araújo *et al.*, 2005; Caldeira *et al.*, 2007).

Na Europa, a observação de genótipos/subtipos associados especificamente ao consumo de drogas intravenosas, sugere que a infecção nos UDIs tem origem numa grande rede de transmissão geográfica, distinta da de outros indivíduos infectados com VHC (Simmonds, 2001). Aliás, estima-se que o VHC tenha sido introduzido neste grupo de risco, provavelmente, na década de 60, altura em que as drogas intravenosas se tornaram populares (revisto em van Asten *et al.*, 2004).

1.3.3 Genotipagem/subtipagem do VHC

Uma vez que os genótipos do VHC apresentam diferentes respostas ao actual regime terapêutico, a sua determinação é importante a nível clínico. (Pawlotsky *et al.*, 2007). A genotipagem do VHC pode ser realizada por testes serológicos ou por análise de ácidos nucleicos (revisto em Chevaliez e Pawlotsky, 2006). A pesquisa de anticorpos contra epitopos específicos de genótipo do VHC, por ensaio imunoenzimático competitivo, identifica os genótipos em 90% dos doentes imunocompetentes cronicamente infectados, não discriminando os diferentes subtipos (revisto em Chevaliez e Pawlotsky, 2006). Apesar da simplicidade e rapidez de execução, estes ensaios são preteridos relativamente aos ensaios de ácidos nucleicos (Simmonds, 1999). Estes últimos, disponíveis em vários *kits* comerciais, utilizam a análise da sequência da região 5'UTR ou a sua hibridação com sondas específicas (Chevaliez e Pawlotsky, 2006). A escolha da região 5'UTR está relacionada com o seu elevado nível de conservação, número de sequências disponíveis nas bases de dados e com a disponibilidade de utilizar os produtos de PCR gerados nos ensaios de diagnóstico (Simmonds, 1999; Murphy *et al.*, 2007). Apesar desta região ser altamente conservada, possui uma série de polimorfismos que permite prever de um modo geral o genótipo mas não o subtipo (Corbet *et al.*, 2003 ; Simmonds *et al.*, 2005; Hrabec *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2007). Ocasionalmente, o genótipo 6 tem sido erradamente classificado como 1 devido à identidade da 5'UTR deste genótipo com a dos subtipos 1a e 1b (Laperche *et al.*, 2005).

Para além da sua aplicação para fins terapêuticos, a genotipagem do VHC é bastante útil em estudos de epidemiologia molecular (Murphy *et al.*, 2007). Estes estudos incluem a investigação de surtos de infecção, factores de risco relacionados com a transmissão, evolução viral e origem e disseminação da epidemia do VHC através da monitorização da distribuição das estirpes circulantes (Pybus *et al.*, 2001; Simmonds, 2004; Pybus *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2007). Ainda que mais demorado e dispendioso, o método de referência para a

determinação correcta do genótipo do VHC consiste na sequenciação directa de determinadas regiões subgenómicas suficientemente variáveis, geralmente E1 ou NS5B, seguida do alinhamento com sequências conhecidas e análise filogenética (Simmonds *et al.*, 1993, Simmonds *et al.*, 1994; Simmonds, 1999; Cantaloube *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2007). Este método, para além de fornecer uma genotipagem exacta, permite ainda a discriminação dos diferentes subtipos do VHC, crucial em estudos epidemiológicos (Murphy *et al.*, 2007). Para além da sua utilização na identificação e classificação do VHC, a análise filogenética permite avaliar distâncias e estabelecer relações evolutivas entre as sequências do VHC (Simmonds *et al.*, 1993). Sendo a recombinação descrita como um evento raro no VHC e dadas as dificuldades inerentes à utilização do genoma completo, a genotipagem/subtipagem baseada numa única região do genoma viral continua a ser a abordagem mais frequentemente usada.

Finalmente, interessa referir que para que um novo genótipo/subtipo seja identificado e confirmado são necessárias metodologias mais exaustivas. A designação provisória dos subtipos do VHC requer uma análise filogenética rigorosa das sequências das regiões C/E1 e NS5B obtidas a partir de três ou mais indivíduos diferentes não epidemiologicamente relacionados. A designação definitiva é adquirida após uma análise filogenética intensiva que inclua, pelo menos, uma sequência de genoma completo do subtipo candidato e que exclua eventos de recombinação (Simmonds *et al.*, 2005)

Em Portugal, como anteriormente referido, desconhece-se grandemente os genótipos e subtipos do VHC circulantes, havendo, até à data, apenas 5 sequências de isolados portugueses depositadas nas bases de dados internacionais. Tendo como alvo uma população de utilizadores de drogas injectáveis de Lisboa, os principais objectivos deste estudo foram: i) estimar a seroprevalência do VHC; ii) determinar a infecção activa nos indivíduos seropositivos através da detecção de RNA genómico viral; iii) determinar a distribuição dos diferentes genótipos e subtipos; iv) avaliar a presença de vírus recombinantes; e v) estabelecer relações filogenéticas das sequências dos vírus portugueses entre si e com outras estirpes mundiais retiradas das bases de dados, de forma a inferir sobre a possível origem dos vírus portugueses. O cumprimento dos objectivos propostos permitirá uma abordagem preliminar da importância social e económica da infecção pelo VHC em Portugal e, ainda, obter um conjunto de sequências nucleotídicas que serão disponibilizadas nas bases de dados internacionais, contribuindo para uma melhor compreensão da epidemiologia da infecção por VHC em Portugal e na Europa.

2. Materiais e métodos

2.1 Caracterização da população estudada

O presente estudo, inserido num projecto para o estudo do VIH financiado pela Fundação *GlaxoSmith Kline* das ciências da Saúde, envolveu a colheita de 135 amostras de sangue provenientes de indivíduos pertencentes a uma população de utilizadores de drogas injectáveis do Centro de Atendimento a Toxicodependentes das Taipas, em Lisboa.

As amostras foram colhidas, com consentimento informado (Anexo I), entre Março de 2008 e Fevereiro de 2009, tendo sido acompanhadas do preenchimento voluntário de um inquérito epidemiológico anónimo (Anexo II) que permitiu obter informação sobre uma série de características epidemiológicas, nomeadamente, género, idade, nacionalidade, escolaridade, profissão, ausências do país, terapêutica e comportamentos de risco (partilha de material de injeção e relações sexuais não protegidas). Variáveis como a escolaridade, profissão e terapêutica não foram consideradas na caracterização epidemiológica dos indivíduos por razões relacionadas com o preenchimento e/ou relevância para o objectivo do estudo. A informação referente ao estatuto serológico para o VIH-1 e VIH-2 das amostras estudadas foi fornecida por um estudo realizado em paralelo. Os dados dos inquéritos foram corrigidos e tratados (anexo III) de forma a estudar a associação entre as características epidemiológicas dos indivíduos e os resultados obtidos neste trabalho.

2.2 Preparação das amostras biológicas

Cerca de 10 ml de sangue periférico colhido por punção venosa, foram introduzidos em tubos *Falcon* contendo 1 ml de solução aquosa de citrato de sódio a 3,8% (p/v). Após centrifugação 15 min, 200 xg, o sobrenadante correspondente ao plasma foi retirado e distribuído por tubos *Eppendorf*, devidamente identificados, que foram guardados a -80°C.

O plasma obtido (5 µl) foi testado relativamente à seropositividade para o VHC, através do imunoensaio qualitativo para detecção de anticorpos *ImmunoFlow HCV* (Core Diagnostics, Reino Unido), segundo as instruções do fabricante.

Por último, foi efectuada a extracção de RNA do VHC, a partir de 150µl de plasma das amostras seropositivas, usando o kit de extracção comercial *INSTANT VIRUS RNA Kit*, de acordo com as instruções do fabricante (Analytik Jena, Alemanha). O RNA viral foi sujeito a

uma primeira eluição com 30 µl de água sem RNases (preparação de RNA mais concentrada), seguida de uma segunda eluição com o mesmo volume de água sem RNases, de forma a aumentar o rendimento da extracção. O RNA resultante da primeira eluição, distribuído por 3 tubos *Eppendorfs* em volumes de 5 µl, 5 µl e 20 µl, e o da segunda eluição foi guardado a -80°C até posterior utilização.

2.3 Síntese de cDNA

O RNA viral, extraído no passo anterior, foi utilizado numa reacção de transcrição reversa com o kit *RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas, Lituânia), para a síntese de cDNA. Num tubo de 0,5 ml sem RNases, 5 µl de RNA viral foram misturados com 1 µl de *primers* ao acaso (*Random Hexamer Primer*, 0,2 µg/µl) e o volume ajustado a 12 µl com água tratada com DEPC. A mistura foi então incubada a 70°C, 5 min, seguida de arrefecimento rápido em água gelada, 5 min. A esta preparação de RNA adicionou-se 8 µl de mistura de reacção contendo mistura de dNTPs 2,5 mM, tampão de reacção 2,5X (Tris-HCL 125 mM, KCl 125 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 25 mM), 2,5 U/µl de inibidor de RNases, RiboLockTM RNase *Inhibitor*, e 25 U/µl da enzima transcriptase reversa, *RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase*. A reacção de síntese decorreu num termociclador nas seguintes condições: 25°C, 5 min; 42°C, 60 min; 70°C, 15 min. Os produtos resultantes da transcrição reversa foram mantidos a -20°C até serem utilizados.

2.4 Amplificação por PCR das regiões genómicas 5'UTR, C/E1 e NS5B

Este estudo envolveu a amplificação de fragmentos específicos das regiões 5'UTR e codificadoras de NS5B e junção C/E1, através de reacções de PCR e/ou de *heminested*-PCR. A amplificação por PCR, consistiu numa única reacção, que usou como molde o cDNA do VHC obtido na reacção de transcrição reversa. A reacção de *heminested*-PCR consistiu em duas reacções sucessivas, com o produto resultante da primeira reacção a servir de molde para a segunda. Neste caso, um dos *primers* utilizado foi comum às duas reacções, sendo introduzido um terceiro *primer* mais interno na segunda reacção (Figura 2.1). A amplificação das regiões C/E1 e NS5B foi aplicada apenas às amostras onde foi detectado RNA do VHC quando da amplificação da região 5'UTR.

2.4.1 Desenho e preparação dos *primers*

Os *primers* utilizados para a amplificação das regiões 5'UTR, C/E1 e NS5B do genoma do VHC foram desenhados com base no alinhamento múltiplo de uma série de sequências nucleotídicas de referência, pertencentes a vários genótipos e subtipos do VHC, disponíveis na base de dados de *Los Alamos* (<http://hcv.lanl.gov/content/hcv-index>) e em dados publicados por diferentes autores (Corbet *et al.*, 2003; Sandres-Sauné *et al.*, 2003; Hraber *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2007). O fragmento amplificado com os *primers* desenhados para a região C/E1 abrange maioritariamente a região E1. No entanto, como tem início ainda na região codificadora do *core*, foi atribuída a designação C/E1 em vez de apenas E1. Os *primers* liofilizados foram usados para preparar soluções aquosas *stock* a 200 µM, as quais foram diluídas para se obter soluções de trabalho a 10 µM e mantidas a -20°C.

Todas as características referentes aos *primers* utilizados (designação, sequência, localização no genoma e temperatura de fusão) encontram-se descritas na tabela 2.1 e figura 2.1.

Tabela 2.1 – Características dos *primers* utilizados nas amplificações por PCR das três regiões do genoma do VHC.

<i>Primer</i> ^a	Sequência ^b (5' - 3')	Posição (nt) ^c	Tm ^d
<i>UTR_f</i>	GAA AGC GTC TAG CCA TGG CGT AGT	71-95	64,4°C
<i>UTR i_r</i>	CTA TCA GGC AGT ACC ACA AGG	279-299	59,8°C
<i>UTR o_r</i>	TGC TCA TGG TGC ACG GTC TAC GAG A	324-348	66,3°C
<i>CE o_f</i>	GCA ACA GGG AA(CT) (CT) T (AGT) CC(CT) GGT TGC TC	834-859	67,7°C
<i>CE i_r</i>	TTC ATC ATC AT(AG) TCC CA (AGCT) GCC AT	1293-1315	58,9°C
<i>NS5B i_f</i>	TAT GA(CT) ACC (AC)GC TG(CT) TTT GAG TC	8256-8278	59,8°C
<i>NS5B_r</i>	GG (AGCT) GC(AGCT) GA (AG) TAC CTG GTC ATA GC(CT) TCC GTG AA	8616- 8647	72,1°C
<i>NS5Bo_f</i>	TGG GGT T(CT)T C(AGCT)T ATG A(CT)A CC(AC) G(AC)T G	8245-8269	63,8°C

^a f= forward; r= reverse; i= inner; o= outer;

^b Os nucleótidos entre parêntesis indicam posições degeneradas ^c Localização da sequência dos *primers* em relação à estirpe de sequência H77 (Nº acesso 004102); A posição nucleotídica dos *primers* foi obtida através da ferramenta "HCV Sequence Locator Tool" (<http://hcv.lanl.gov/cgi-bin/LOCATE/locate.cgi>); ^d Temperatura de fusão.

2.4.2 Amplificação das regiões 5'UTR, C/E1 e NS5B por PCR e/ou *heminested-PCR*

Com o objectivo de detectar a presença de infecção activa, todas as amostras seropositivas para VHC foram sujeitas à amplificação da região 5'UTR por RT-PCR, tendo

sido utilizado o conjunto de *primers* *UTRo_r* e *UTR_f*, numa concentração de 40 nM. Nas amostras em que não se detectou produto de amplificação, recorreu-se a um protocolo de *hemined-PCR*, tendo sido utilizados os *primers* *UTR i_r* e *UTR_f*, numa segunda reacção.

Para a amplificação da região C/E1 foi elaborado um protocolo, constituído por uma única reacção de PCR, com os *primers* *CEo_f* e *CEi_r* numa concentração de 80 nM.

Como estratégia de amplificação da região NS5B foi efectuada uma única reacção de PCR com 120 nM dos *primers* *NS5Bi_f* e *NS5B_r*. Para duas amostras, foi ainda aplicado um protocolo de *hemined-PCR* onde foram utilizados 120 nM dos *primers* *NS5Bo_f* e *NS5B_r* na primeira reacção e 120 nM dos *primers* *NS5Bi_f* e *NS5B_r* na segunda reacção.

Na figura 2.1 está representado um esquema das regiões amplificadas, *primers* utilizados e o tamanho dos fragmentos esperados.

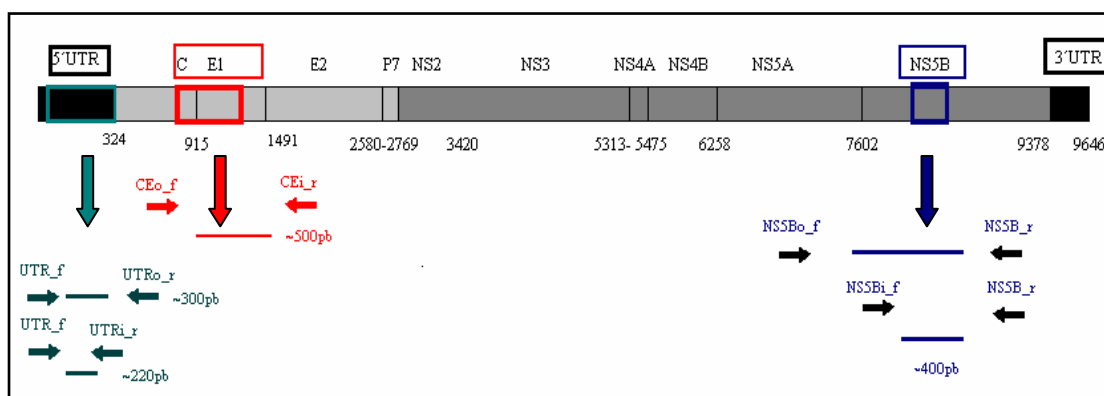


Figura 2.1- Representação esquemática das regiões genómicas amplificadas, *primers* utilizados para cada região e o tamanho aproximado dos fragmentos obtidos. Os fragmentos esperados para as regiões 5'UTR, C/E1 e NS5B são, respectivamente, ~ 300pb, ~500pb, ~400pb; pb= pares de bases.

Em todos os protocolos de amplificação foi utilizado o sistema *illustraTM puReTaqTM Ready-To-GoTM PCR beads* (GE Healthcare, Reino Unido), segundo as instruções do fabricante. Cada esfera (*bead*), quando reconstituída num volume final de 25 µl dá origem a uma mistura de reacção consistindo em 200 µM de cada dNTP, Tris-HCl 10 mM, pH 9,0, KCl 50 mM e MgCl₂ 1,5 mM. A reconstituição das esferas liofilizadas foi feita com uma solução aquosa dos *primers* a utilizar, para as concentrações indicadas. Para uma maior uniformização das condições de reacção e diminuição do aparecimento de erros inerentes à manipulação dos reagentes, foi preparada, para o conjunto das amplificações (*n*), uma *master mix*. A *master mix*, contendo ddH₂O e *primers* específicos num volume correspondente a *n*+1,5 volumes de reacção, foi posteriormente distribuída pelas respectivas esferas. O passo seguinte consistiu na adição de cDNA e/ou produto da primeira reacção de PCR às esferas hidrolizadas, perfazendo

um volume final de reacção de 25 µl. De um modo geral, na reacção de PCR, usou-se 5 µl de cDNA para a amplificação das regiões 5'UTR e C/E1 e 2 µl de cDNA para a amplificação da região NS5B. No protocolo de *heminested*-PCR, transferiu-se 0,5-2 µl do produto do primeiro PCR para a segunda reacção. Para todas as amplificações foram efectuados controlos negativos, onde foi utilizada ddH₂O em vez de cDNA, de forma a despistar qualquer possibilidade de contaminação. Nas tabelas 2.2, 2.3 e 2.4, encontram-se descritas as condições *standart* de PCR e *heminested*-PCR, utilizadas na amplificação das diferentes regiões. Em alguns casos, para maximizar o rendimento da amplificação e/ou eliminar amplificações inespecíficas, foi necessário recorrer a alterações pontuais dos protocolos, nomeadamente, em relação ao número de ciclos e quantidade de produto de PCR utilizado na segunda reacção de *heminested*-PCR.

Tabela 2.2 – Condições de amplificação utilizadas no protocolo de PCR e *heminested*-PCR para a região 5'UTR do VHC.

<i>Descrição da etapa</i>	<i>Temperatura (°C), tempo(min, seg)*</i>	<i>Nº ciclos</i>
Desnaturação inicial	94°C, 2 min	1x
Amplificação: Desnaturação Emparelhamento <i>primers</i> Síntese DNA	94°C, 1 min (30seg, hN-PCR) 60°C, 1 min (30seg, hN-PCR) 72° C, 1 min	35x
Extensão final	72°C, 10 min	1x

* As alterações das condições de amplificação aplicadas à segunda reacção de *heminested*-PCR encontram-se assinaladas por “hN-PCR”.

Tabela 2.3 – Condições de amplificação utilizadas no protocolo de PCR para a região C/E1 do VHC.

<i>Descrição da etapa</i>	<i>Temperatura (°C), tempo(min)</i>	<i>Nº ciclos</i>
Desnaturação inicial	94°C, 2 min	1x
Amplificação: Desnaturação Emparelhamento <i>primers</i> Síntese DNA	94°C, 0,5 min 62°C, 0,5 min 72°C, 1 min	50x
Extensão final	72°C, 10 min	1x

Tabela 2.4 – Condições de amplificação utilizadas no protocolo de PCR e *heminested*-PCR para a região NS5B do VHC.

<i>Descrição da etapa</i>	<i>Temperatura (°C), tempo (min,seg)</i>	<i>Nº ciclos</i>
Desnaturação inicial	94°C, 2 min	1x
Pré- amplificação		3x
Desnaturação	94°C, 0,5 min	
Emparelhamento <i>primers</i>	55°C, 45 seg	
Síntese DNA	72°C, 1 min	
Amplificação		35x
Desnaturação	94°C, 0,5 min	
Emparelhamento <i>primers</i>	60°C, 0,5 min	
Síntese DNA	72°C, 1 min	
Extensão final	72°C, 10 min	1x

2.4.3 Visualização dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose (Agarose MP, Boehringer Mannheim, Alemanha) a 2% (p/v) em solução tampão TAE 0,5X, diluído a partir de uma solução stock 50X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8,0), à qual se adicionou 0,5 µg/ml de brometo de etídeo. Para a corrida, aplicou-se no gel uma mistura de 5 µl de produto de PCR e 2,5 µl de tampão de aplicação [Tris-HCl 100mM, pH 7,6, azul de bromofenol a 0,03% (p/v), xileno cianol a 0,03% (p/v), glicerol a 60% (p/v), e EDTA 60 mM]. A electroforese decorreu durante aproximadamente uma hora, a 100 V. A visualização da migração dos produtos de PCR foi feita por exposição a radiação UV (254 nm) e a imagem captada num aparelho *Gel-Doc XR* (BioRad, EUA). O tamanho dos fragmentos foi analisado por comparação com o marcador de comprimento molecular do tipo “escada” de 100 pb (*GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus*, Fermentas, Lituânia).

2.4.4 Purificação dos produtos de PCR

A partir de um volume de 20 µl de produto de PCR, obtido para as regiões C/E1 e NS5B, foi efectuada a respectiva purificação através do sistema de purificação *QIAquick® PCR Purification Kit* (QIAGEN, Alemanha), segundo as instruções do fabricante.

Posteriormente, todos os produtos purificados foram analisados como descrito no ponto anterior. A concentração de DNA purificado foi estimada por comparação da intensidade das bandas das amostras com a das bandas do marcador de comprimento molecular de concentração conhecida (*GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus*, Fermentas Life Sciences). O produto purificado foi guardado a -20°C para posterior sequenciação.

2.4.5 Clonagem de produtos de PCR no vector pGEM®-T Easy

A clonagem de produtos de PCR foi efectuada no vector plasmídico de 3018 pb, pGEM®-T Easy (Promega, França), tendo consistido num passo de ligação T/A entre o vector e o produto a clonar, seguido de transformação de células *E.coli* JM109, selecção e crescimento de clones recombinantes, extracção de DNA plasmídico e análise do mesmo.

A reacção de ligação foi efectuada em 10 µl contendo 3 µl do produto de PCR, 5 µl do tampão de ligação 2X [Tris-HCl 60 mM, pH 7,8, MgCl₂ 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2 mM, PEG a 10% (p/v)], 1 µl do vector *pGEM®-T Easy* (50 ng) e 1 µl de ligase de DNA do T4 (3U/µl), e decorreu durante a noite a 4° C. Paralelamente, foram preparadas células *E. coli* JM109 competentes para serem usadas na transformação. Realizou-se uma pré-cultura desta estirpe bacteriana em 3 ml de meio LB líquido com crescimento durante a noite, a 37°C, com agitação. No dia seguinte, 150 µl desta cultura saturada foram inoculados em 15 ml de meio LB, tendo o crescimento celular decorrido como anteriormente descrito, até uma DO₆₅₀ de 0,3-0,5 nm. As células foram então colhidas por centrifugação a 4°C, 4500 xg, 10 min, e ressuspensas em 1 ml de TSS (LB 1X, PEG6000 a 10%, DMSO a 5%, MgSO₄ 50 mM). As células ressuspensas em TSS (100 µl) foram adicionadas a 5 µl de mistura de ligação, previamente arrefecida em gelo. O mesmo procedimento foi efectuado para os devidos controlos sendo adicionado, em substituição da mistura de ligação, 1 µl de pKS (*pBluescript* KS II, SIGMA) ao controlo positivo e 5 µl de ddH₂O ao controlo negativo. Após incubação durante 1 hora em gelo, as células foram submetidas a um choque térmico de 90 segundos a 42° C, seguido de 5 min em gelo. Adicionou-se então 900 µl de meio LB a 37°C, seguindo-se uma hora de incubação a 37°C. A suspensão bacteriana foi semeada em placas de meio LB sólido [agar Bacto a 1,5% (p/v) em LB líquido] suplementado com 100 µg/ml de ampicilina, 80 µg/ml de X-gal (Fermentas, Lituânia) e 20 µg/ml de IPTG (Fermentas, Lituânia), e incubada durante a noite, numa estufa, a 37°C. Terminada a incubação, seleccionaram-se as

colónias brancas (potenciais clones recombinantes), para inoculação de 2,5 ml de meio LB com ampicilina (100 µg/ml), e crescimento durante a noite a 37°C, com agitação.

A extracção do DNA plasmídico, a partir de 2 ml de cultura celular, foi efectuada por lise alcalina baseada no método de *H.C. Birnboim e J. Doly* (Birnboim e Doly, 1979). A cultura bacteriana (2 ml) foi centrifugada 5 min, 16000 xg, e os sedimentos ressuspensos em 200 µl de Tampão TEG (glicose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris 25Mm pH 8,0). As células foram então lisadas pela adição de 200 µl de solução de lise [NaOH 0,2 M, SDS a 1,5% (p/v)], seguido da adição de 200 µl de KOAc 3 M (pH 5,4), mistura do sal por inversão dos tubos e centrifugação do precipitado a 16000 xg, 15 min. O sobrenadante foi transferido para tubos com igual volume de isopropanol (MERCK, Alemanha) e centrifugado 16000 xg, 30 min, temperatura ambiente. O sedimento de ácido nucleico foi lavado com etanol (MERCK, Alemanha) a 70% (p/v), seco ao ar, ressuspenso em 30 µl de ddH₂O com 50 µg/ml de RNase, e incubado durante 1 hora a 37°C.

Para a detecção de moléculas de DNA plasmídico potencialmente recombinantes, as preparações de ácido nucleico foram sujeitas a uma electroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v) em TAE 0,5X e analisado o seu padrão de migração. Partindo do pressuposto que as moléculas com migração mais retardada são de maiores dimensões e, conseqüentemente, possuem o inserto pretendido, procedeu-se à sua digestão com a endonuclease de restrição *Eco RI*. A digestão do DNA plasmídico foi feita em 15 µl de mistura de reacção, contendo 10 U de enzima de restrição *Eco RI* (Fermentas, Lituânia) em tampão Eco RI 1X [Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, Triton X-100 a 0,02% (p/v), 0,1 mg/ml BSA] e 2 µl de DNA plasmídico, a 37°C, durante 90 min. O resultado das digestões foi analisado por electroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v) e os clones bacterianos, correspondentes às amostras com o inserto de tamanho esperado, foram crescidos em 4 ml de meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/ml), 37°C, durante a noite, com agitação.

Os plasmídeos recombinantes foram purificados através do sistema de purificação *Qiagen Plasmid Mini Kit* (QIAGEN, Alemanha), segundo instruções do fabricante, quantificados por electroforese como descrito em 2.4.3 e guardados a -20°C para posterior sequenciação.

2.5 Sequenciação de DNA

Após purificação, todos os produtos de PCR e de clonagem foram enviados para os serviços da STAB VIDA (Oeiras, Portugal) onde foram directamente sequenciados no sequenciador automático *ABI 3730XL* (Applied biosystems) com o kit *BigDye[®] terminator VI.1* (Applied Biosystems, EUA). Os *primers* utilizados para a sequenciação dos produtos de PCR foram os *primers forward* usados na amplificação por PCR das regiões 5'UTR, C/E1 e NS5B, ou seja *UTR_f*, *CE o_f* e *NS5B i_f*, respectivamente. Os *primers* usados para a sequenciação da amostra clonada foram o *CEo_f* e o *primer* universal *SP6*.

2.6. Análise bioinformática das sequências obtidas

2.6.1 Análise e correcção das sequências nucleotídicas e proteicas

Todas as sequências obtidas foram, numa primeira fase, submetidas a uma pesquisa de homologia genética usando o programa *HCVdb BLAST Search* (<http://www.hcvdb.org/blast.asp>), de forma a confirmar a sua identidade. Após confirmação, as sequências foram cuidadosamente analisadas e editadas manualmente no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999). Esta edição consistiu na verificação da concordância entre o cromatograma e a sequência obtida e da presença de picos sobrepostos ou outros artefactos, tendo sido feitas, para todos os casos, as devidas correcções. O critério escolhido para os casos em que ocorreu a presença de dois picos sobrepostos de diferente tamanho para a mesma posição nucleotídica foi a atribuição do nucleótido correspondente ao pico com maior intensidade. Nos casos em que os dois picos sobrepostos tinham, exactamente, a mesma intensidade, foi mantido o nucleótido atribuído pela sequenciação automática. Para além da verificação e correcção de erros foi feita a eliminação dos segmentos nucleotídicos relativos à parte inicial da sequência nucleotídica (~40 nucleótidos iniciais) e ao *primer* incluído na sequência.

Posteriormente, as sequências nucleotídicas editadas foram traduzidas pelo programa *Gene Runner 3.01* (*Hastings Software Inc*, disponível *online* no endereço <http://www.generunner.net/>), com o objectivo de verificar a concordância entre a sequência nucleotídica e proteica, de forma a minimizar a possibilidade de erros nas sequências obtidas. Nos casos onde as sequências não revelaram a concordância esperada, foi efectuada a devida

correção através do auxílio das ferramentas *online* BLASTX e BLASTN (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome).

Terminada esta fase, as sequências nucleotídicas das amostras em estudo, foram analisadas ao nível filogenético.

2.6.2 Análise filogenética

As sequências nucleotídicas obtidas neste trabalho foram alinhadas com sequências de referência através do programa MAFFT *version* 6 (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/software/>) utilizando-se os parâmetros de alinhamento pré-definidos no programa. Posteriormente, os alinhamentos obtidos foram analisados no programa *Bioedit* de forma a verificar a concordância no tamanho da região em estudo.

A construção das árvores filogenéticas foi feita no programa Mega 4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007), de acordo com o método de *Neighbor-joining*, segundo o modelo de *Kimura* a dois parâmetros. O teste de inferência filogenética foi baseado no método de *bootstrapping* (Felsenstein, 1985), sendo utilizado para o efeito, 1000 réplicas. Os agrupamentos com valores de *bootstrap* acima de 75% foram considerados estatisticamente significativos (Higgs e Attwood, 2005). As distâncias genéticas foram também calculadas através do programa Mega 4.0.2, segundo o modelo de *Kimura* a dois parâmetros.

A metodologia escolhida para a construção das árvores filogenéticas foi a obtenção de uma árvore para cada região genómica (C/E1 e NS5B) e uma árvore concatenada, isto é, uma árvore que inclui as duas regiões em estudo ligadas (C/E1+NS5B). Assim, numa primeira abordagem, para cada região genómica, foi construída uma árvore filogenética que incluiu sequências de referência retiradas de genomas completos presentes nas bases de dados e todas as sequências obtidas no decurso deste trabalho. Paralelamente, foi feita a mesma árvore mas utilizando as sequências concatenadas. De acordo com os genótipos obtidos na construção da primeira árvore, foram construídas novas árvores filogenéticas referentes a cada um dos genótipos em particular. Neste caso, para além das sequências retiradas de genomas completos, foram utilizadas, sempre que possível, sequências subgenómicas provenientes de indivíduos infectados com semelhanças epidemiológicas (*e.g.* grupo de risco, origem geográfica). As sequências utilizadas foram retiradas da base de dados *online Hepatitis C Viral Database* (<http://www.hcvdb.org>) e do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

Para a construção das árvores destinadas à subtipagem foram utilizadas sequências de referência retiradas dos genomas completos, com os seguintes números de acesso: **Genótipo 1:** AF511950 (1a), AY587016 (1b), AY051292 (1c), AM910652 (1g); **Genótipo 2:** AY746460 (2a), DQ430817 (2b), D50409 (2c), DQ155561 (2i), AB031663 (2k); **Genótipo 3:** X76918 (3a), D49374 (3b), D63821 (3k); **Genótipo 4:** NC_009825 (4a), FJ025856 (4b), DQ516083 (4d), EU392169 (4f), EU392171 (4k); **Genótipo 5:** NC_009826 (5a); **Genótipo 6:** AY859526 (6a), AY878652 (6n), D84264 (6k); **Genótipo 7 (outgroup):** EF108306 (7a).

Para a construção das árvores filogenéticas relativas a genótipos individuais foram utilizadas as sequências retiradas de genoma completo (para ambas as regiões C/E1 e NS5B) com os seguintes números de acesso: **Genótipo1: (1a)** EU362878, AF011752, AF011751, AF011753, AF511950, D10749, M62321, AJ278830, AY956466, AY956463, AY257428, AY257451; **(1b)** AJ000009, AJ32996, AB154186, AF176573, AF483269, M84754, U16362, AY587016, AF313916, AY898932; **Genótipo 3 (3a)** DQ437509, DQ430819, DQ430820, X76918, D28917, AF046866, D17763, AY956467, AJ880744 **Genótipo 4 (4a)** DQ418782, DQ516084, DQ988079, DQ418784, DQ418787, DQ988075, NC_009825, DQ418788, DQ418783, DQ418785, DQ988074, AY257440, AY257441, AY257423, AY743064, AY743207, AJ291252, AJ291255, AJ291267; **(4d)** DQ516083, DQ418786, EU392172, AJ291290, AY743130, AY743121, AJ291289; **Genótipo 7 (outgroup):** EF108306 (7a). Foram ainda utilizadas sequências adicionais específicas de UDIs retiradas de genomas parciais disponíveis apenas para a região NS5B ou para as regiões E1 e NS5B com os seguintes números de acesso: **Região NS5B, Genótipo 3 (3a)** AJ867141, AJ867144, AJ867164, AJ867148, EF195047; **Região NS5B e E1: Genótipo 4 (4a)** AJ291245 (NS5B) / AJ401094 (E1), AJ291268 (NS5B) /AJ401096 (E1); **(4d)** AJ291292 (NS5B) /AJ401101 (E1), AJ291258 (NS5B) /AJ401095 (E1).

2.7 Análise estatística

A associação entre a prevalência do VHC e respectivos subtipos com as características epidemiológicas dos indivíduos em estudo (idade, gênero, nacionalidade, comportamentos de risco) foi analisada estatisticamente através do teste *t* de student, teste do X^2 e (ou) teste exacto de *Fisher* (Kirkman, 1996). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $P < 0,05$ (Dallal, 2007).

2.8 Números de acesso das sequências nucleotídicas

As 134 sequências nucleotídicas obtidas no âmbito deste estudo foram submetidas ao *GenBank*, com os seguintes números de acesso: FN400948-FN400957, FN400959-FN401013 (C/E1) e FN401073-FN401082, FN401084-FN401140 (NS5B).

3. Resultados

3.1 Características da população estudada

O presente estudo envolveu a colheita de 135 amostras de sangue, provenientes de indivíduos pertencentes a uma população frequentadora do Centro de Atendimento a Toxicodependentes das Taipas, em Lisboa. Todas as amostras colhidas vieram acompanhadas de um inquérito epidemiológico voluntário (anexo II), de forma a averiguar possíveis associações entre as características epidemiológicas dos indivíduos e a prevalência da infecção por VHC, genótipos e subtipos virais circulantes.

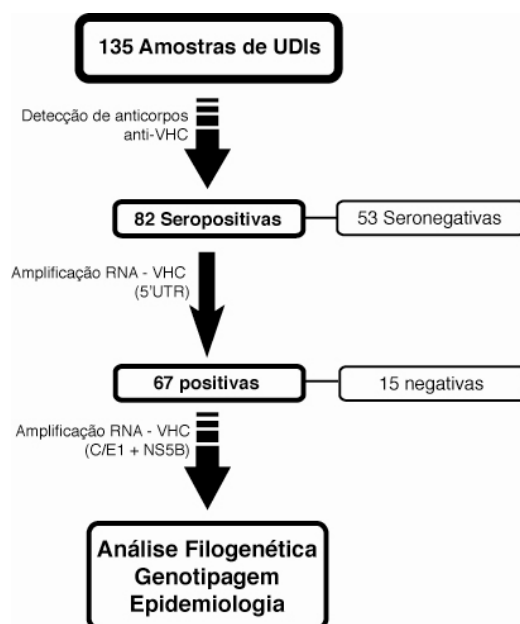


Figura 3.1 – Esquema representativo do algoritmo usado na selecção das amostras colhidas ($n = 135$) desde a colheita até à análise filogenética ($n = 67$).

Na Figura 3.1 encontra-se representado o algoritmo de selecção das amostras, desde a fase de colheita ($n = 135$) até à análise filogenética ($n = 67$). O conjunto das 135 amostras provém maioritariamente de indivíduos de nacionalidade portuguesa (87,4%), do género masculino (72,6%) (Figura 3.3) e com uma média de idades de $37,6 \pm 8,5$ anos. Relativamente aos comportamentos de risco, a partilha de material de injeção foi relatada em 29,0% ($n = 39$), enquanto que a prática de relações sexuais não protegidas foi confirmada em 79,8% (103 respostas afirmativas em 129 respostas dadas) dos casos. Dos 135 indivíduos, 23 (17,0%) estão infectados com o VIH-1.

3.2 Prevalência de anticorpos anti-VHC

Todas as amostras colhidas foram sujeitas à determinação da seropositividade para o VHC, tendo sido obtida uma prevalência de anticorpos anti-VHC de 60,7% (82/135) (Figura 3.2). Em termos globais, 12,6% (17/135) dos indivíduos possuem anticorpos anti-VHC e anti-VIH-1. Dos 82 indivíduos seropositivos para o VHC, 79,3% (65/82) apresentam anticorpos apenas para o VHC, enquanto que 20,7% (17/82) possuem anticorpos anti-VHC e anti-VIH-1. Por outro lado, 17 dos 23 indivíduos com anticorpos anti-VIH-1 possuem anticorpos anti-VHC, reflectindo uma prevalência de anticorpos anti-VHC entre os indivíduos seropositivos para VIH-1 de 73,9% ($P=0,07$).

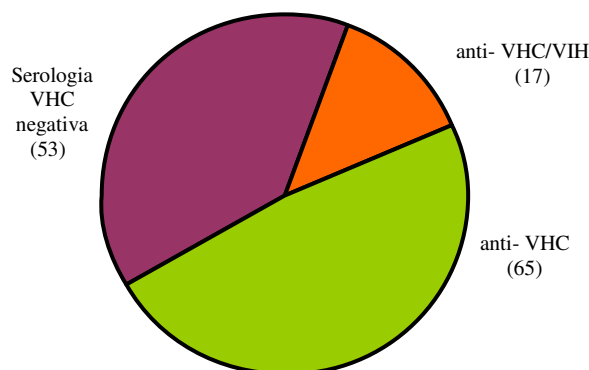


Figura 3.2 – Representação gráfica do estatuto serológico das 135 amostras colhidas; os valores indicados entre parêntesis representam o número de amostras de cada categoria.

Analisando as características epidemiológicas dos indivíduos seropositivos para o VHC (Anexo III) é possível observar uma elevada prevalência do género masculino em comparação com o género feminino: 76,8% ($n = 63$) *versus* 23,2% ($n = 19$), respectivamente, o que reflecte as prevalências de géneros da população estudada (Figura 3.3). A média de idade dos 82 indivíduos é de 40,0 ($\pm 7,1$) anos, variando entre os 21 e os 56 anos. Em relação à origem geográfica, os indivíduos de nacionalidade portuguesa constituem a maioria (90,2%) dos indivíduos seropositivos, sendo que os restantes 9,8% (8/82) correspondem a indivíduos originários de França ($n = 2$), Eslovénia ($n = 1$), África do Sul ($n = 1$), Angola ($n = 3$) e Moçambique ($n = 1$). A partilha de material de injeção foi relatada em 46,3% (38/82) dos indivíduos e a prática de relações sexuais não protegidas em 83,1% (64 respostas afirmativas em 77 respostas dadas). Dados epidemiológicos referentes aos 53 indivíduos seronegativos

para o VHC (média de idade de $34,0 \pm 9,3$ anos, 33,9% do género feminino *versus* 64,0% do género masculino, 11,3% infectados com VIH-1) demonstraram a prática de relações sexuais não protegidas em 75% dos casos, tendo a partilha de material de injeção sido relatada apenas por 1 indivíduo (1 *versus* 52). Este dado indica que 38 dos 39 indivíduos (97,4%) que afirmaram partilhar material de injeção possuem anticorpos anti-VHC ($P=0,00$). Não foram verificadas outras associações estatisticamente significativas entre as variáveis analisadas (dados epidemiológicos e infecção com VIH-1) e o estatuto serológico para o VHC ($P>0,05$).

3.3 Prevalência de infecção activa

Para 81,7% (67/82) dos indivíduos seropositivos para o VHC, foi possível detectar a presença de RNA genómico viral, um factor indicativo de infecção activa. Na tabela 3.1 encontram-se registados os dados epidemiológicos dos 67 indivíduos com infecção activa. Verifica-se uma elevada prevalência (82,1%) de indivíduos do género masculino infectados em comparação com os do género feminino (17,9 %) (Figura 3.3). A média de idades é $39,8 \pm 7,3$ anos para o género masculino e $37,8 \pm 5,9$ anos para o género feminino (média global de $39,5 \pm 7,07$ anos).

Tabela 3.1 – Dados epidemiológicos e estatuto serológico para o VIH-1, referentes aos UDIs ($n = 67$) infectados com VHC. n = Número de amostras por categoria.

	Género		Nacionalidade		Partilha material de injeção	Relações sexuais não protegidas	Co-infecção VHC-VIH
	M	F	PT	Outra *			
<i>n</i>	55	12	59	8	28	53	15
%	82,1%	17,9%	88,1%	11,9%	41,8%	82,8%	22,4%

* França ($n = 2$), Eslovénia ($n = 1$), África do Sul ($n = 1$), Angola ($n = 3$) e Moçambique ($n = 1$); M – masculino; F – feminino; PT – Portugal;

A grande maioria (88,1%) dos indivíduos infectados é de nacionalidade portuguesa. A partilha de material de injeção foi reportada por 41,8% (28/67), tendo a grande maioria (53 em 64 respostas dadas, 82,8%) praticado relações sexuais não protegidas. A prevalência de indivíduos co-infectados com VIH-1 é de 22,4% (15/67). Tendo em conta que 23 dos 135

indivíduos estão infectados com o VIH-1 e 15 destes possuem infecção activa por VHC, a prevalência de infecção por VHC entre UDIs seropositivos para o VIH-1 é de 65,2% (15/23). Observa-se também uma maior percentagem de indivíduos seropositivos para o VIH-1 com infecção activa por VHC (88,2%, 15/17) comparativamente com os indivíduos seronegativos para VIH-1 (80,0%, 52/65), ainda que a diferença não seja estatisticamente significativa ($P > 0,05$).

As amostras seropositivas para o VHC que não demonstraram amplificação da região 5'UTR ($n = 15$, 18,3%) foram analisadas relativamente à ocorrência de associação estatisticamente significativa entre a ausência de RNA viral e as características epidemiológicas dos indivíduos. Assim, relativamente ao género, verifica-se que apenas 12,7% (8/63) dos indivíduos do género masculino seropositivos não possuem infecção activa, enquanto que nos indivíduos seropositivos do género feminino a ausência de infecção activa se regista em 36,8% (7/19) dos casos ($P = 0,02$) (Figura 3.3). É de salientar que apenas 13,3% (2/15) dos indivíduos seropositivos para VHC sem infecção activa estão infectados com o VIH-1 ($P > 0,05$).

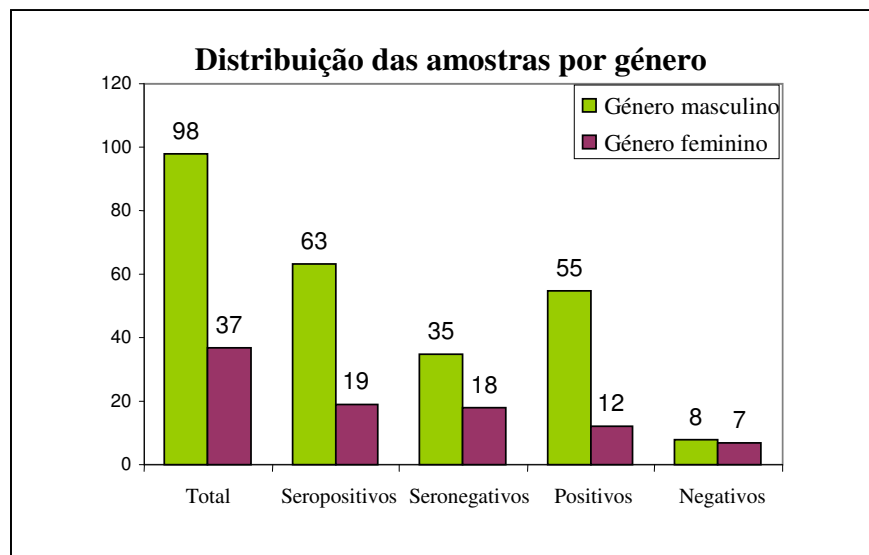


Figura 3.3 – Distribuição das amostras por género: total ($n = 135$), seropositivos para VHC ($n = 82$), seronegativos para VHC ($n = 53$), detecção positiva de RNA-VHC ($n = 67$), sem detecção de RNA-VHC ($n = 15$). O número por cima de cada barra corresponde ao número de amostras por género em cada categoria.

3.4 Amplificação dos fragmentos correspondentes às regiões 5'UTR, C/E1 e NS5B

3.4.1 Desenho dos *primers*

O desenho dos *primers* específicos para as regiões genómicas estudadas foi feito com base no alinhamento múltiplo de sequências de referência, pertencentes aos genótipos e subtipos do VHC mais prevalentes, disponíveis na base de dados de *Los Alamos*. Desta forma, foi possível identificar as regiões conservadas comuns às sequências alinhadas e, consequentemente, desenhar os *primers* para cada porção da região pretendida.

Devido ao elevado grau de variabilidade genética das regiões C/E1 e NS5B, os *primers* projectados para estas duas regiões possuem algumas posições degeneradas para garantir o sucesso da amplificação. Pelo contrário, os *primers* para a região 5'UTR, não possuem qualquer posição degenerada, o que está de acordo com o elevado grau de conservação a nível nucleotídico desta região, entre os diferentes genótipos do VHC (Murphy *et al.*, 2007). Com base no tamanho das sequências nucleotídicas, grau de degeneração e temperatura de fusão dos *primers*, foram elaborados os três protocolos de amplificação para os fragmentos pretendidos, correspondentes às três regiões do genoma do VHC.

3.4.2 Amplificação das regiões 5'UTR, C/E1 e NS5B por RT-PCR

Neste estudo foi conduzida uma série de reacções de PCR, tendo como matriz cDNA obtido numa reacção de transcrição reversa, com o objectivo de obter os produtos de amplificação correspondentes a porções específicas das regiões 5'UTR, NS5B e C/E1.

a) Detecção de infecção activa: Amplificação da região 5'UTR

De um total de 82 amostras seropositivas para o VHC, 81,7% (67/82) amplificaram, com sucesso, um fragmento de aproximadamente 300 pb correspondente à quase totalidade da 5'UTR (Figura 3.4). O par de *primers* *UTR_f* e *UTRo_r* amplificou 97,0% ($n = 65$) das amostras através de uma única reacção de PCR, enquanto que em 3,0 % ($n = 2$) a amplificação só foi visualizada com duas reacções sucessivas, através de um protocolo de *heminested*-PCR. Neste caso, foram utilizados os *primers* externos *UTR_f* e *UTRo_r* na primeira reacção, seguidos dos *primers* *UTR_f* e *UTR i_r* numa segunda reacção. Em 18,3%

(15/82) das amostras seropositivas não foi possível amplificar a região 5'UTR com os três *primers* disponíveis.

Na Figura 3.4 encontra-se ilustrado um gel de electroforese representativo do padrão de bandas obtido na amplificação da região 5'UTR, através de um protocolo de PCR baseado numa única reacção.

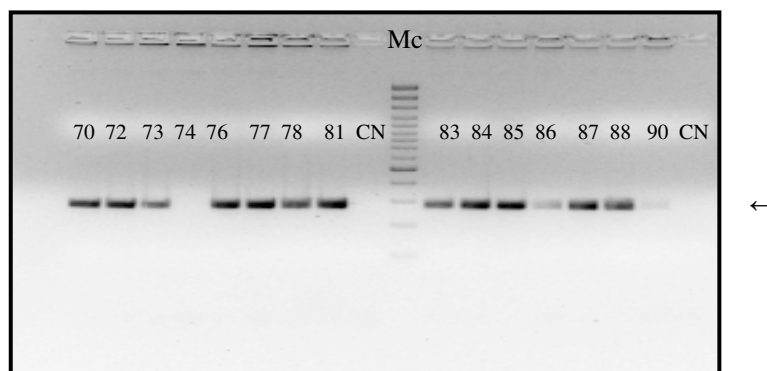


Figura 3.4 – Visualização dos produtos de PCR resultantes da amplificação da região 5'UTR com os primers *UTR_f* e *UTR_o_r*, a partir de 5 µl de cDNA, após electroforese em gel de agarose a 2% (p/v). A seta indica o fragmento de ~300 pb, correspondente ao produto de amplificação. CN = Controlo Negativo. Mc – marcador de tamanho molecular (escala de 100 pb). Os números por cima das bandas correspondem à identificação das amostras.

b) Amplificação da região NS5B e C/E1 por RT-PCR

Para fins de subtipagem e análise filogenética, o cDNA das 67 amostras com amplificação positiva para a região 5'UTR foi usado na amplificação das regiões C/E1 e NS5B através de um protocolo de PCR ou *heminested*-PCR. A escolha entre PCR e *heminested*-PCR dependeu essencialmente do rendimento da amplificação da região 5'UTR. Em alguns casos, o protocolo de PCR e/ou *heminested*-PCR inicialmente estabelecido sofreu ligeiras variações. Para algumas amostras, dependendo da região amplificada e do sucesso de amplificação para a região 5'UTR, a quantidade de produto utilizado na segunda reacção oscilou entre 0,5 µl e 2 µl. Por outro lado, para a amplificação da região NS5B, o número de ciclos da reacção de PCR previamente estabelecido foi reduzido (de 47 para 35), de forma a eliminar o aparecimento de produtos inespecíficos.

Os *primers* desenvolvidos e as condições de PCR optimizadas permitiram amplificar, sem inespecificidade e em quantidade adequada, as regiões C/E1 (~500 pb) e NS5B (~400 pb) para todas as amostras com infecção activa ($n = 67$) (Figura 3.5). Apenas para duas das

amostras foi efectuado *heminested-PCR* (2 reacções sucessivas de 35 ciclos de amplificação) para a região NS5B (*primers NS5Bo_f / NS5B_r* seguido de *NS5Bi_f / NSRB_r*) de modo a obter quantidade suficiente de produto. Uma única reacção de PCR, consistindo em 50 ciclos de amplificação, aplicada à região C/E1 gerou uma quantidade adequada de produto em todas as amostras.

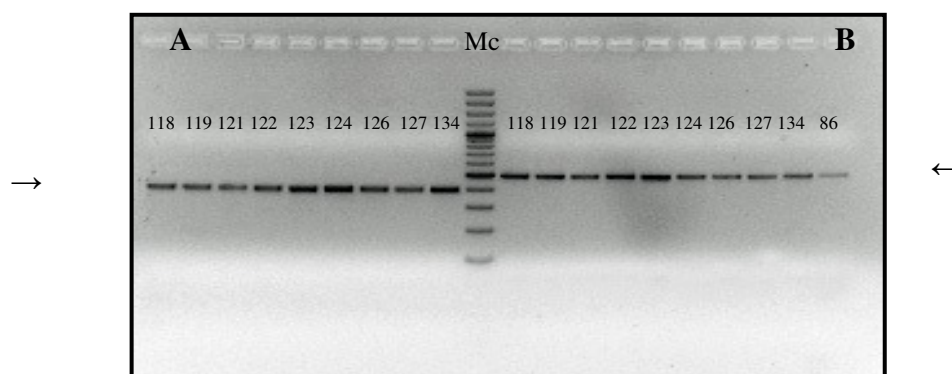


Figura 3.5 – A) Observação dos produtos de PCR resultantes da amplificação da região NS5B com os primers *NS5B i_f* e *NS5B_r*, a partir de 2 µl de cDNA, após electroforese em gel de agarose a 2% (p/v). **B)** Observação dos produtos de PCR resultantes da amplificação da região C/E1 com os primers *CEi_f* e *CEo_r*, a partir de 5 µl de cDNA, após electroforese em gel de agarose a 2%. As setas em A e B indicam o tamanho dos fragmentos obtidos (~400pb e ~500 pb, respectivamente). Mc – marcador de tamanho molecular (escala de 100pb). Os números por cima das bandas correspondem à identificação das amostras.

3.5 Análise filogenética

3.5.1 Construção de árvores filogenéticas

Com excepção de uma, todas as sequências obtidas através da sequenciação directa dos produtos de PCR das regiões NS5B e C/E1 revelaram qualidade adequada para a genotipagem e análise filogenética. A análise do cromatograma da amostra 56C_PT revelou uma extensa sobreposição de picos ao longo de toda a sequência tendo sido necessário proceder à respectiva clonagem e sequenciação dos clones recombinantes. A análise das sequências dos 4 clones sequenciados revelou total concordância entre as várias sequências, sugerindo a ausência de uma infecção mista como causa das dificuldades inicialmente experimentadas, tendo-se seleccionado apenas um dos clones para os estudos filogenéticos subsequentes.

No contexto da verificação da identidade das sequências obtidas através da pesquisa de homologia genética, foram ainda identificadas as estirpes do VHC, provenientes das bases de dados, filogeneticamente mais próximas das estirpes em estudo, bem como os respectivos

genótipos e subtipos. Após a fase de verificação, as sequências obtidas foram alinhadas entre si e com sequências disponíveis nas bases de dados, representativas de diferentes genótipos e subtipos do VHC. Devido à elevada diversidade genotípica do VHC, não foi possível incluir sequências de todos os subtipos (>80 subtipos) na análise filogenética. Desta forma, foi efectuada uma selecção com base nos subtipos mais comuns na Europa e nesta população de risco e ainda considerados os genótipos e subtipos com maior homologia indicados pela pesquisa BLAST.

Para avaliar as relações filogenéticas das 67 estirpes do VHC entre si e com as sequências do VHC das bases de dados, foram construídas árvores filogenéticas baseadas nas sequências nucleotídicas parciais codificadoras das regiões C/E1 e NS5B. Na construção das árvores foi utilizado como *outgroup*, a sequência do VHC relativa ao novo subtipo putativo 7a (EF108306). O argumento que sustentou a escolha desta sequência foi baseado na comparação entre árvores com dois *outgroups* diferentes: a sequência do VHC do subtipo 7a *versus* a sequência do VHGB (Vírus da Hepatite G – Tipo B), o vírus mais estreitamente relacionado com o VHC (Simmonds, 1999). Em todas as construções filogenéticas foi observado o aparecimento de ambas as estirpes num ramo independente e afastado das sequências dos restantes genótipos, o que reflecte a sua função como *outgroup*. No entanto, o facto de a sequência do VHGB ser geneticamente mais distante das sequências do VHC dos restantes genótipos do que a sequência do VHC do subtipo 7a, causou a introdução de um maior número de *gaps* nas sequências alinhadas, reflectindo-se em sequências de menores dimensões e, consequentemente, em valores de *bootstrap* inferiores.

Construíram-se árvores filogenéticas para cada uma das duas regiões individualmente, tendo-se obtido uma boa concordância em termos de topologia. Os valores de *bootstrap* foram mais baixos para a região NS5B do que para a região C/E1 (resultados não apresentados), justificado pelo tamanho mais reduzido do fragmento analisado no caso da NS5B e ainda pelo baixo grau de variabilidade genética desta região comparativamente com C/E1. De forma a aumentar o rigor da análise, as sequências do VHC das duas regiões foram concatenadas resultando num aumento do número de posições nucleotídicas analisadas. Efectivamente, quando comparámos as três abordagens, foi perceptível que a análise baseada na região NS5B é a que traduz com menos fiabilidade as relações filogenéticas entre as estirpes estudadas e que a análise baseada na sequência concatenada (C/E1+NS5B) dá origem a agrupamentos suportados por valores de *bootstrap* mais elevados, justificando a sua utilização.

3.5.2 Subtipos do VHC circulantes em UDIs

Na Figura 3.7 está apresentada a árvore filogenética construída com base no alinhamento de todas as sequências concatenadas (C/E1 + NS5B) obtidas com as sequências correspondentes de referência representativas de diferentes genótipos/subtipos do VHC. Esta árvore mostra uma separação clara tanto entre grupos de sequências que correspondem a genótipos diferentes como entre subgrupos relativos a subtipos diferentes. Os valores de *bootstrap* de 99% que suportam estes agrupamentos conferem um elevado grau de certeza à inferência filogenética e, consequentemente, à genotipagem e subtipagem efectuadas. Observa-se que para as regiões C/E1 e NS5B, todas as sequências das 67 amostras do VHC estudadas aparecem inequivocamente agrupadas (valores de *bootstrap* de 99%) com as sequências das bases de dados pertencentes aos genótipos 1 ($n = 37$), 3 ($n = 15$) e 4 ($n = 15$), não havendo nenhuma sequência agrupada com as sequências de referência dos genótipos 2, 5 e 6. Estes resultados indicam claramente uma elevada prevalência do genótipo 1 nesta população (55,2%), seguida dos genótipos 3 e 4, ambos responsáveis por 22,4% das infecções. Dentro dos genótipos 1, 3 e 4, as diferentes sequências do VHC dos UDIs estudados distribuem-se por vários subgrupos suportados por valores de *bootstrap* de 99%, que incluem as sequências de referência representativas de diferentes subtipos do VHC dentro de cada genótipo. O subtipo 1a é responsável pela maioria das infecções por VHC (49,2%, $n = 33$), seguido dos subtipos 3a ($n = 15$) com 22,4% das infecções, 4a com 13,4% ($n = 9$), 4d com 9,0% ($n = 6$) e, por último, 1b que infecta apenas 6,0% ($n = 4$) dos indivíduos (Figura 3.6). É de notar que todos os subtipos do VHC identificados através da análise filogenética são concordantes com os subtipos previamente sugeridos pela análise BLAST de pesquisa de homologia genética.

Com base na concordância total relativamente à subtipagem obtida para as duas regiões analisadas individualmente (árvores não apresentadas), juntamente com o facto de não existirem ramos que se destaquem por um maior comprimento sugestivo de elevada divergência genética, foi afastada a hipótese da existência de estirpes do VHC recombinantes a circular nesta população no que respeita às regiões subgenómicas analisadas.

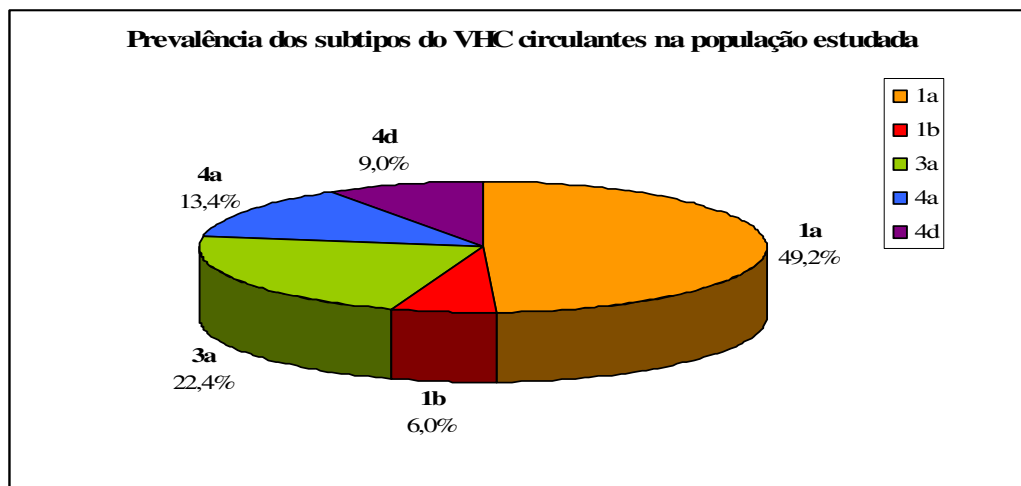


Figura 3.6 – Prevalência dos subtipos do VHC circulantes na população de UDIs estudada.

Para uma análise mais detalhada do perfil epidemiológico dos genótipos 1, 3 e 4 circulantes nesta população de UDIs, foram construídas árvores para cada um dos três genótipos individualmente (Figuras 3.8, 3.9, 3.10). Esta análise permitiu incluir um maior número de sequências retiradas das bases de dados, de forma a estabelecer as relações filogenéticas entre as estirpes do VHC estudadas e isolados do VHC de diferentes regiões geográficas. Sempre que possível, foram também utilizadas sequências do VHC das bases de dados provenientes de indivíduos utilizadores de drogas injectáveis.

Figura 3.7

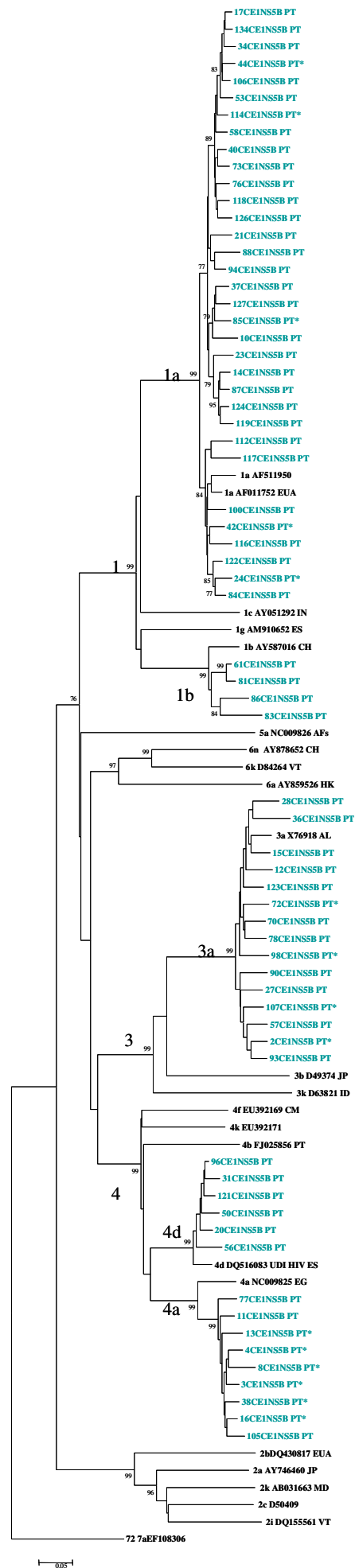


Figura 3.7 (p. 39) – Relações filogenéticas entre estirpes do VHC provenientes dos indivíduos infectados com Hepatite C do presente estudo e estirpes de referência representativas de vários genótipos e subtipos do VHC, baseadas na análise das regiões concatenadas C/E1 (385 pb) e NS5B (285 pb), usando a estirpe EF108306 (subtipo 7a) como *outgroup*. As sequências dos indivíduos em estudo estão indicadas pelo número da amostra e região analisada terminando no sufixo PT (azul), enquanto que as sequências de referência (negrito) possuem a designação do respectivo subtipo, seguidas do número de acesso e local de origem, quando disponível. A árvore foi obtida pelo método de *Neighbor-joining*, a partir de distâncias calculadas através do método de *Kimura* a dois parâmetros. Apenas estão representados os valores de *bootstrap* acima de 75, correspondentes a 1000 réplicas; * - indivíduos co-infectados com VIH-1; IN – Índia, ES – Espanha, CH – China, AFs – África do Sul, VT – Vietname, HK – Hong Kong, AL – Alemanha, JP – Japão, ID – Indonésia, CM – Camarões, EG -Egipto, EUA – Estados Unidos da América, MD – Moldávia, PT – Portugal. A escala representa a distância genética.

Relativamente ao **genótipo 1** (Figura 3.8), as 37 sequências analisadas surgem inseridas em agrupamentos constituídos pelas sequências de referência pertencentes aos subtipos 1a ($n = 33$) e 1b ($n = 4$), agrupamentos esses suportados por valores de *bootstrap* de 100%. Dentro do **subtipo 1a** evidencia-se ainda a formação de dois grandes subgrupos de sequências, suportados por valores de *bootstrap* >75%, dentro dos quais se dispersam as sequências dos UDIs do estudo juntamente com as sequências das bases de dados. Em cada um destes subgrupos é ainda visível alguma estruturação interna caracterizada por grupos de 2 a 6 sequências suportados por valores de *bootstrap* >75%. Estes agrupamentos internos são exclusivamente constituídos por sequências do estudo, o que é sugestivo de estirpes epidemiologicamente relacionadas através de transmissão local.

Em relação ao **subtipo 1b**, as 4 sequências portuguesas encontram-se distribuídas de forma dispersa entre as sequências de referência do subtipo 1b. No entanto, duas das sequências, identificadas como 61CE1NS5B_PT e 81CE1NS5B_PT, formam por si só um grupo suportado por um valor de *bootstrap* de 100%, o que sugere fortemente que estejam epidemiologicamente relacionadas.

Figura 3.8

Genótipo 1

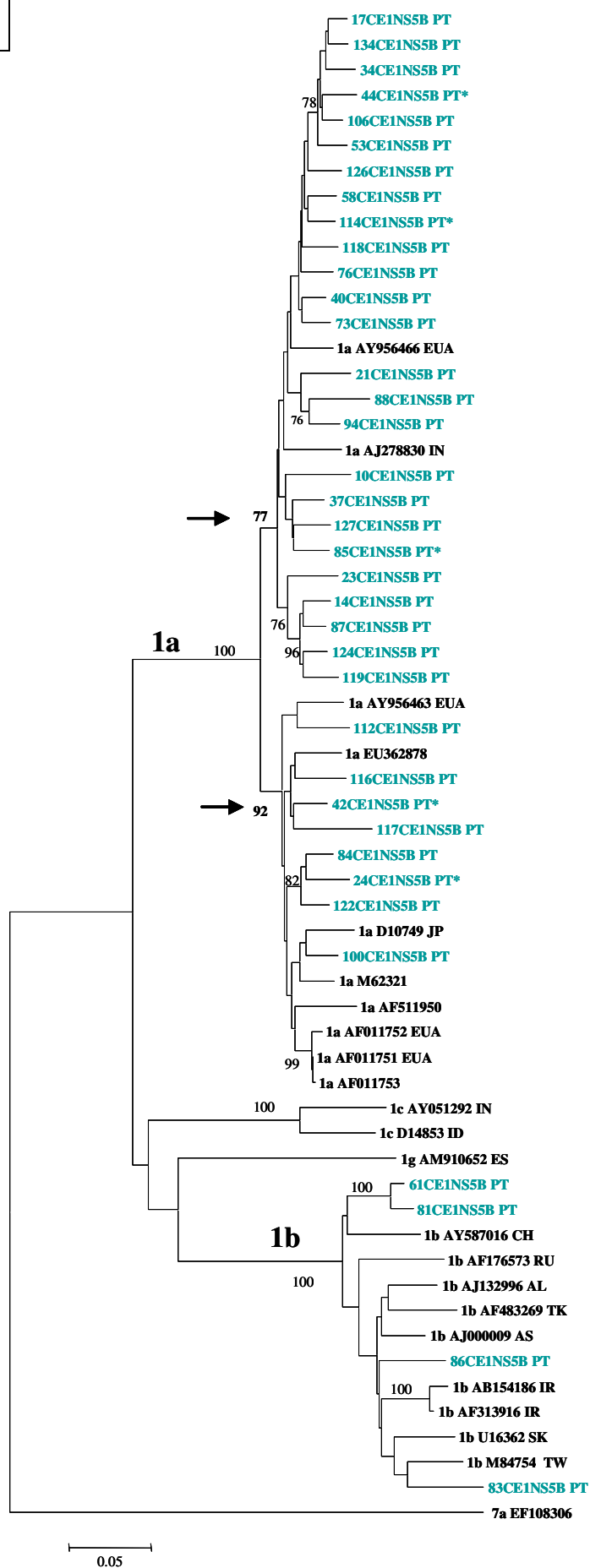


Figura 3.8 (p.41) – Relações filogenéticas entre estirpes do VHC provenientes dos indivíduos infectados com Hepatite C do presente estudo e estirpes de referência representativas do **genótipo 1**, usando a estirpe EF108306 (subtipo 7a) como *outgroup*. Árvore representativa dos subtipos 1a, 1b, 1c e 1g, construída com base nas sequências concatenadas C/E1 (385 pb) + NS5B (288 pb). As estirpes pertencentes aos indivíduos em estudo possuem o número da amostra e região analisada terminando no sufixo PT (azul), enquanto que as sequências de referência (a negrito) possuem a designação do respectivo subtipo, seguidas do número de acesso e, sempre que possível, local de origem. A árvore foi obtida pelo método de *Neighbor-joining*, a partir de distâncias calculadas através do método de *Kimura* a dois parâmetros. Apenas estão representados os valores de *bootstrap* acima de 75, correspondentes a 1000 réplicas; As setas indicam os dois valores de *bootstrap* que suportam os dois grandes subgrupos formados para os subtipo 1a. * - indivíduos co-infectados com VIH-1; IN – Índia, ES – Espanha, AL- Alemanha, JP – Japão, ID – Indonésia, IR – Irlanda, EUA – Estados Unidos da América, RU– Rússia, TK – Turquia, TW–Taiwan, AS–Austrália, SK– Coreia do Sul, PT – Portugal. A escala representa a distância genética.

Na Figura 3.9 estão apresentadas as árvores para as regiões C/E1 e NS5B concatenadas (A) e para a região NS5B (B), relativas ao **genótipo 3**.

A apresentação de uma árvore exclusivamente para a região NS5B prende-se com o facto de algumas sequências de UDIs infectados com o genótipo 3 existirem apenas para NS5B. Nas duas árvores todas as sequências surgem inseridas num agrupamento suportado por um elevado valor de *bootstrap*, que inclui as sequências de referência do subtipo 3a, permitindo a sua inclusão clara neste subtipo. É ainda notória a ausência da formação de subgrupos significativos, tanto geográficos como relativos ao grupo de risco, *i.e.* UDIs, dentro do subtipo 3a, havendo uma total dispersão de todas as sequências em ambas as árvores.

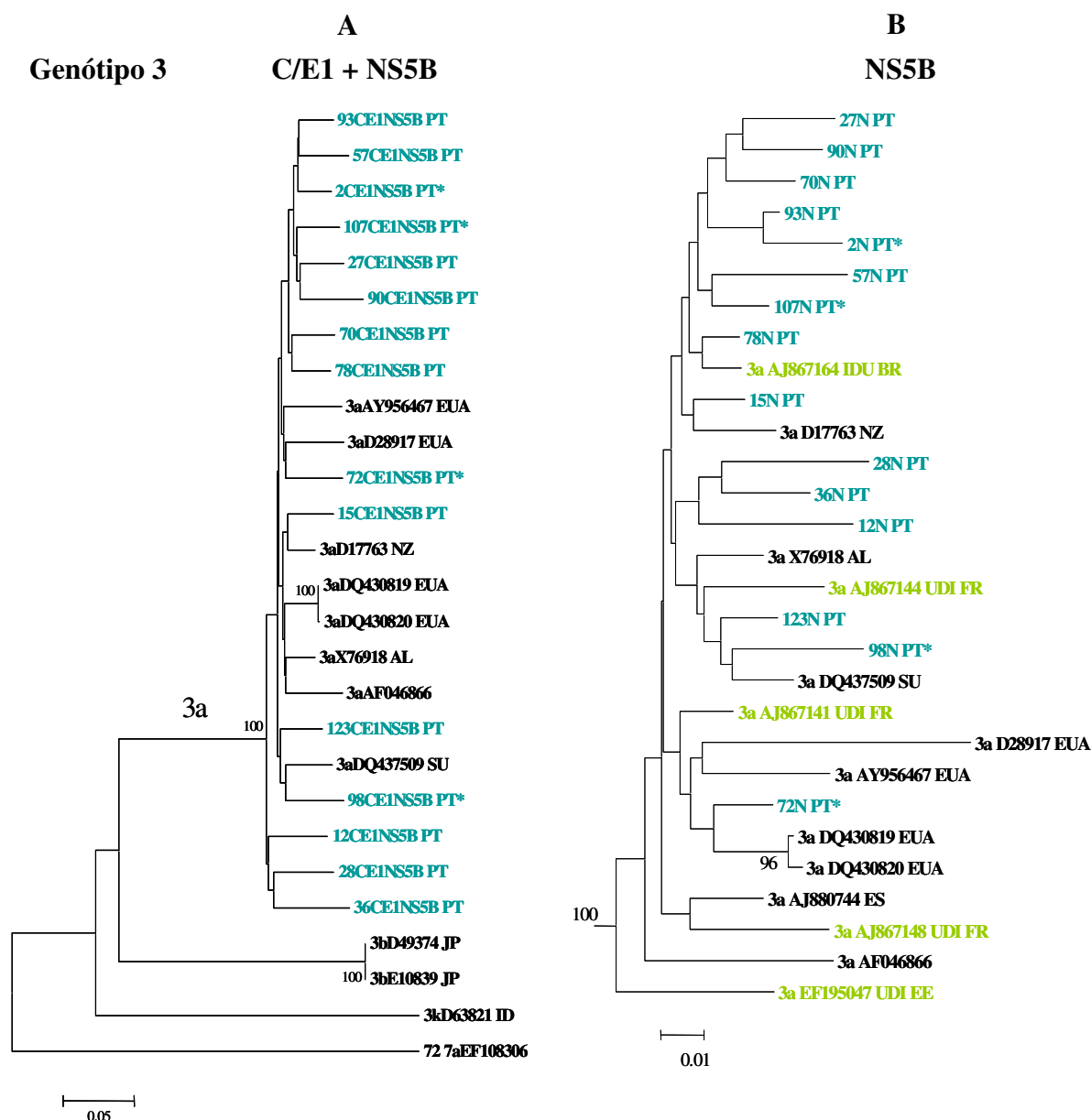


Figura 3.9 – Relações filogenéticas entre estirpes do VHC provenientes dos indivíduos infectados com Hepatite C do presente estudo e estirpes de referência representativas do **genótipo 3**, usando a estirpe EF108306 (subtipo 7a) como *outgroup*. **A** – Árvore representativa dos subtipos 3a, 3b e 3k construída com base nas sequências concatenadas (C/E1 (381 pb) + NS5B (289 pb)); **B** – Árvore representativa da porção relativa ao subtipo 3a, construída com base na região NS5B (238 pb), incluindo 5 sequências de referência adicionais de estirpes do VHC provenientes de UDIs (verde). As estirpes pertencentes aos indivíduos em estudo possuem o número da amostra e região analisada terminando no sufixo PT (azul), enquanto que as sequências de referência sem grupo de risco associado (a negrito) possuem a designação do respectivo subtipo, seguidas do número de acesso e, sempre que possível, local de origem. A árvore foi obtida pelo método de *Neighbor-joining*, a partir de distâncias calculadas através do método de *Kimura* a dois parâmetros. Apenas estão representados os valores de *bootstrap* acima de 75, correspondentes a 1000 réplicas; * - indivíduos co-infectados com VIH-1; AL – Alemanha, JP – Japão, ID – Indonésia, EUA – Estados Unidos da América, SU – Suíça, NZ – Nova Zelândia, EE – Estónia, BR – Brasil, FR – França, PT – Portugal, ES – Espanha. A escala representa a distância genética.

Na Figura 3.10 está apresentada a árvore filogenética correspondente ao **genótipo 4**, baseada na concatenação das regiões C/E1 e NS5B. A introdução de três sequências provenientes de um estudo realizado em França com o mesmo grupo de risco (Morice *et al.*, 2001) condicionou a análise a sequências com menos 15 nucleótidos de comprimento. No entanto, continuou-se a observar uma boa segregação dos subtipos. Assim, constatamos a formação de dois agrupamentos bem definidos (valor de *bootstrap* de 100%) constituídos pelas sequências da população estudada e por sequências das bases de dados referentes aos subtipos 4a e 4d, não existindo nenhuma sequência portuguesa inserida nos restantes subtipos. Estes dados indicam que, para as regiões C/E1 e NS5B, seis indivíduos estão infectados com o subtipo 4d, enquanto que os restantes nove estão infectados com o subtipo 4a. Dentro do **subtipo 4a**, observa-se a formação de um subgrupo bem suportado (valor de *bootstrap* de 88%) onde as 9 sequências estudadas dos UDIs de Portugal se agrupam com duas sequências provenientes de UDIs europeus (um UDI co-infectado com VIH-1 de Espanha e um UDI de França), indicando um relacionamento epidemiológico próximo para os isolados 4a circulantes nos UDIs da Europa. A maior distância genética verificada para as sequências 4a do Egipto ($d = 0,097 \pm 0,008$), comparativamente com as sequências europeias ($d = 0,060 \pm 0,005$), sugere que as estirpes do VHC circulantes no Egipto são bastante mais heterogêneas e epidemiologicamente distantes entre si do que os isolados 4a circulantes nos UDIs de Portugal, Espanha e França. Relativamente ao **subtipo 4d**, as sequências da população estudada encontram-se dispersas entre sequências 4d de Espanha (UDI), França (UDI) e Norte de África.

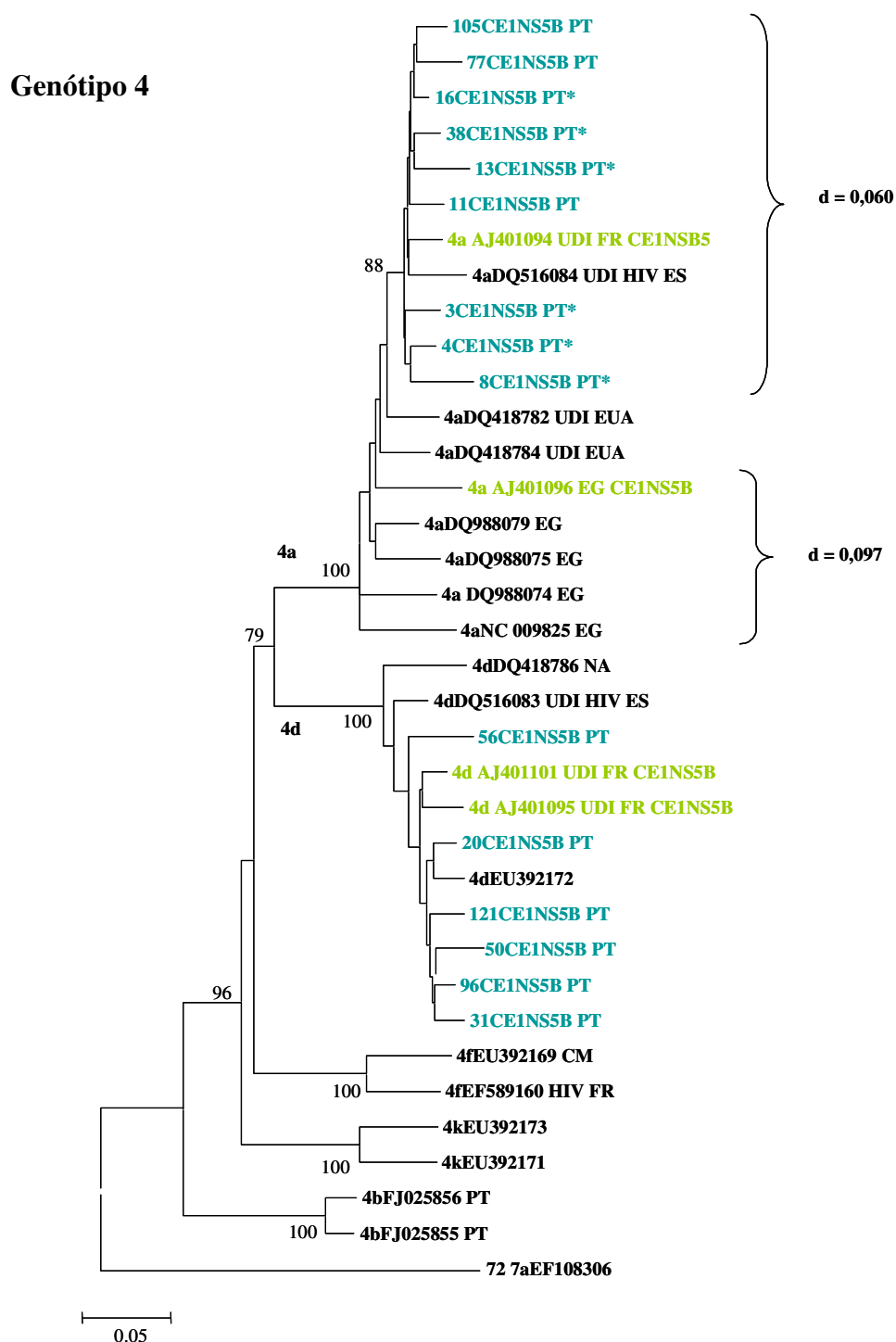


Figura 3.10 – Relações filogenéticas entre estirpes do VHC provenientes dos indivíduos infectados com Hepatite C do presente estudo e estirpes de referência representativas do **genótipo 4**, usando a estirpe EF108306 (subtipo 7a) como *outgroup*. Árvore representativa dos subtipos 4a, 4b, 4d, 4f e 4k, construída com base nas sequências concatenadas (C/E1 (376 pb) + NS5B (280 pb) mais 4 sequências de referência adicionais de estirpes do VHC (verde). As estirpes pertencentes aos indivíduos em estudo possuem o número da amostra e região analisada terminando no sufixo PT (azul), enquanto que as sequências de referência (a negrito) possuem a designação do respectivo subtipo, seguidas do número de acesso e, sempre que possível, local de origem. A árvore foi obtida pelo método de *Neighbor-joining*, a partir de distâncias calculadas através do método de *Kimura* a dois parâmetros. Apenas estão representados os valores de *bootstrap* acima de 75, correspondentes a 1000 réplicas; os valores indicados com um “d” dizem respeito às distâncias genéticas calculadas a partir do método de *Kimura* a dois parâmetros (1000 réplicas) * - indivíduos co-infectados com VIH-1; ES – Espanha, EG – Egipto, FR – França, PT – Portugal, EUA – Estados Unidos da América, NA – Norte de África, CM – Camarões. A escala representa a distância genética.

3.5.3 Distâncias genéticas

Os cálculos referentes às distâncias genéticas médias totais e intra-subtipo para as regiões C/E1 e NS5B encontram-se representados na tabela 3.2. As distâncias genéticas obtidas para a região C/E1 são claramente superiores à da região NS5B, reflectindo com grande probabilidade as diferentes pressões selectivas a que estas duas regiões estão sujeitas (Smith *et al.*, 1997).

Tabela 3.2 – Distâncias genéticas médias totais e intra-subtipo (método de *Kimura* a dois parâmetros) para as regiões C/E1 e NS5B. d–Distância. DP – Desvio-Padrão. *n*–Número de amostras por subtipo. As distâncias encontram-se na forma de valor absoluto.

	1a (<i>n</i> = 33)	1b (<i>n</i> = 4)	3a (<i>n</i> = 15)	4a (<i>n</i> = 9)	4d (<i>n</i> = 6)	Distância genética total
d (C/E1)	0,100	0,104	0,103	0,061	0,065	0,378
DP	0,009	0,013	0,009	0,007	0,008	0,025
d (NS5B)	0,051	0,067	0,065	0,049	0,031	0,302
DP	0,007	0,011	0,008	0,008	0,007	0,025

Para as duas regiões, as maiores distâncias genéticas foram observadas dentro do subtipo 1b (C/E1, 0,104; NS5B, 0,067), seguido do subtipo 3a (C/E1, 0,103; NS5B, 0,065) e 1a (C/E1, 0,100; NS5B, 0,051). Comparativamente com os subtipos dos genótipos 1 e 3, as distâncias genéticas encontradas para o genótipo 4, subtipos 4a (C/E1, 0,061; NS5B, 0,049) e 4d (C/E1, 0,065; NS5B, 0,031), foram substancialmente inferiores, sugerindo uma introdução mais recente deste último genótipo nesta população.

A discrepância relativamente ao número de amostras de cada subtipo pode, em parte, influenciar as distâncias genéticas obtidas. Contudo, apesar de haver uma elevada semelhança entre os subtipos 1a, 1b e 3a (C/E1: 0,100, 0,104, 0,103, respectivamente) parece ser clara a diferença relativamente aos subtipos 4a e 4d (C/E1: 0,061 e 0,065, respectivamente).

3.6 Subtipos do VHC e co-infecção com VIH-1

A tabela 3.3 mostra a prevalência dos subtipos do VHC nos indivíduos co-infectados com VIH-1 (*n* = 15) e mono-infectados com VHC (*n* = 52). O subtipo 4a é o subtipo mais prevalente nos indivíduos co-infectados com VIH-1 (40,0%), seguido dos subtipos 1a (33 %)

e 3a (26,7 %). Os subtipos 1b e 4d não foram encontrados nestes indivíduos. Nos 9 indivíduos infectados com o subtipo 4a, 6 possuem infecção por VIH-1, verificando-se uma associação estatisticamente significativa ($P=0,003$) entre este subtipo do VHC e a infecção por VIH-1. Para os restantes subtipos do VHC obtidos não foi encontrada nenhuma associação significativa com a presença de co-infecção com VIH-1 ($P>0,05$).

Tabela 3.3 – Distribuição dos subtipos do VHC obtidos para os 67 UDIs estudados de acordo com a presença/ausência de co-infecção com VIH-1.

Subtipos	VHC-VIH (%)	VHC (%)	Total (%)
1a^a	5 (33,3)	28 (53,9)	33 (49,2)
1b^b	0	4 (7,7)	4 (6,0)
3a^c	4 (26,7)	11 (21,2)	15 (22,4)
4a^d	6 (40,0)	3 (5,7)	9 (13,4)
4d^e	0	6 (11,5)	6 (9,0)
Total	15 (100)	52 (100)	67 (100)

Indivíduos mono-infectados versus indivíduos co-infectados: ^a 1a, $P>0,05$; ^b 1b, $P>0,05$; ^c 3a, $P>0,05$; ^d 4a, $P=0,003$; ^e 4d, $P>0,05$ (Teste exacto de Fisher). Indicam-se a negrito as associações estatisticamente significativas.

3.7 Características epidemiológicas e subtipos do VHC

Os dados referentes aos inquéritos dos 67 indivíduos inseridos no estudo foram analisados estatisticamente de forma a relacionar características epidemiológicas (género, idade, nacionalidade, relações sexuais não protegidas e partilha de material de injeção) com os diferentes subtipos do VHC identificados. Através da análise da tabela 3.4, constata-se que não foi possível estabelecer qualquer associação estatisticamente significativa entre os subtipos do VHC e a idade, nacionalidade e comportamentos de risco ($P>0,05$). No entanto, apesar de o número de indivíduos do género masculino ser substancialmente maior do que os do género feminino, verifica-se uma associação estatisticamente significativa entre o género feminino e o subtipo 3a ($P=0,02$), existindo mais indivíduos do género feminino infectados com o subtipo 3a do que seria esperado.

Tabela 3.4 – Prevalência e distribuição dos subtipos do VHC obtidos para os 67 UDIs do estudo de acordo com o género, idade, nacionalidade, e comportamentos de risco.

Subtipos	Género		Média idade (anos) \pm DP*	Nacionalidade		Relações sexuais não protegidas			Partilha de material de injeção		Total
	Masculino (%)	Feminino (%)		PT**	Outra***	Sim	Não	N.R.****	Sim	Não	
1a	30 (90,9)	3 (9,1)	38,7 \pm 6,8	27 (81,8)	6 (18,2)	27 (81,8)	5 (15,2)	1 (3)	13 (39,4)	20 (60,6)	33
1b	4 (100)	0	38,3 \pm 8,5	4 (100)	0	4 (100)	0	0	1 (25,0)	3 (75,0)	4
3a	8 (53,3)	7 (46,7)	40,5 \pm 7,9	13 (86,7)	2 (13,3)	10 (66,7)	4 (26,7)	1 (6,7)	8 (53,3)	7 (46,7)	15
4a	8 (88,9)	1 (11,1)	38,6 \pm 7,9	9 (100)	0	6 (66,7)	2 (22,2)	1 (11,1)	3 (33,3)	6 (66,7)	9
4d	5 (83,3)	1 (16,7)	43,0 \pm 10,5	6 (100)	0	6 (100)	0	0	3 (50,0)	3 (50,0)	6
Total	55 (82,1)	12 (17,9)	39,8 \pm 8,3	59 (88,1)	8 (11,9)	53 (79,1)	11 (16,4)	3 (4,5)	28 (41,8)	39 (58,2)	67

Indicam-se a negrito as associações estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

* DP = Desvio- Padrão

** PT = Portuguesa

*** = França (2), Eslovénia (1), África do Sul (1), Angola (3), Moçambique (1)

**** = Não Respondeu

4. Discussão e conclusões

Este estudo teve como principal objectivo descrever a distribuição de genótipos e subtipos do VHC circulantes numa população de UDIs de Lisboa, de forma a obter informação sobre a diversidade genética do VHC neste grupo de risco e contribuir assim para uma melhor compreensão da epidemiologia da infecção por VHC em Portugal. A importância e o contributo deste trabalho estão relacionados com a escassez de dados sobre a prevalência de infecção e distribuição de subtipos do VHC em Portugal, não tendo sido publicado até à data qualquer estudo filogenético sobre VHC no nosso país e existindo apenas cinco sequências portuguesas nas bases de dados internacionais. Salienta-se ainda o facto de este estudo se basear na subtipagem de duas regiões subgenómicas do VHC, *i.e.* C/E1 e NS5B, permitindo a detecção de potenciais recombinantes, contrariamente à maioria dos trabalhos de epidemiologia molecular que utilizam apenas uma única região para a atribuição dos subtipos. Por outro lado, tendo em conta que 1) a utilização de drogas injectáveis constitui actualmente o principal factor de risco associado à infecção por VHC; 2) Portugal apresenta algumas áreas geográficas com estimativas de prevalência do VHC superiores a 90% entre UDIs; 3) as estirpes circulantes nos UDIs disseminam-se para a população em geral; e 4) os genótipos são clinicamente importantes no estabelecimento de regimes terapêuticos, torna-se prioritário identificar genótipos e subtipos no sentido da adequação de tratamentos, estudo de vias de transmissão, vigilância da emergência de novas variantes e desenvolvimento de vacinas. (Marinho *et al.*, 2001; Aceijas e Rhodes, 2007; Pawlotsky *et al.*, 2007).

Os dados provenientes dos inquéritos que acompanharam as 135 amostras colhidas foram utilizados para averiguar possíveis associações entre as características epidemiológicas dos indivíduos, prevalência de Hepatite C e genótipos/ subtipos circulantes nesta população. No entanto, a veracidade das respostas dadas deve ser tida em conta na interpretação dos resultados obtidos, uma vez que estas são da exclusiva responsabilidade dos indivíduos participantes no estudo.

A elevada prevalência do género masculino (72,6%) comparativamente com o género feminino (27,4%) verificada na amostragem efectuada está de acordo o padrão observado em vários CATs (Centro de Atendimento a Toxicod dependentes) de Portugal, sugerindo a existência de uma discrepância acentuada ao nível do género nos indivíduos que frequentam

estes centros (Silveira *et al.*, 2004). Dados fornecidos pelo Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (OEDT) indicam que este padrão é igualmente verificado nos países da União Europeia e Noruega (OEDT, 2004).

A prevalência de anticorpos anti-VHC encontrada para as 135 amostras de UDIs indica que 60,7% dos indivíduos já teve contacto prévio com o VHC, podendo ou não possuir infecção activa. Este valor está de acordo com a elevada seroprevalência do VHC estimada para este grupo de risco na Europa Ocidental (37-98%), enfatizando o facto de a transmissão do VHC estar maioritariamente associada à utilização de drogas injectáveis (Mathei *et al.*, 2002; Aceijas e Rhodes, 2007; revisto em Lavanchy, 2009; Sereno *et al.*, 2009). Este facto é ainda mais evidente quando se comparam as prevalências de infecção por VHC nos UDIs e na população em geral (0,2%-2% para a população em geral da Europa Ocidental) (Mathei *et al.*, 2002; WHO, 1999). Relativamente a Portugal, este resultado está de acordo com a seroprevalência do VHC estimada em UDIs, a nível nacional, nas últimas duas décadas: 70%-92% entre 1989-1998 (Marinho *et al.*, 2001) e 41,7%-84,8% em 2006 ([EMCCDA](#), 2008), indicando que, passados quase vinte anos, a seroprevalência do VHC nos UDIs permanece praticamente inalterada, tornando-se urgente a implementação de medidas de prevenção neste grupo de risco.

Informação relativa à seropositividade para VIH-1 das amostras estudadas revelou que 17,0% dos UDIs apresentam anticorpos anti-VIH-1, sendo este facto concordante com os dados de prevalência nacionais (10,9%-20,2%) e europeus (0-40%) neste grupo de risco ([EMCCDA](#), 2008). Este resultado suporta que os UDIs são também um grupo de risco importante para a infecção por VIH, uma evidência largamente documentada por vários autores (van Asten *et al.*, 2004; Aceijas e Rhodes, 2007; March *et al.*, 2007). A baixa seroprevalência combinada do VHC-VIH (12,6%) encontrada poderá ser explicada, em parte, pelo facto de a eficiência de transmissão do VIH ser bastante inferior à do VHC neste grupo de risco (revisto em Lauer e Walker, 2001). Por outro lado, para esta discrepância de valores de seroprevalência também poderá contribuir a diferença de datas de introdução destes vírus, estimando-se que neste grupo de risco a circulação do VHC preceda em pelo menos duas décadas a do VIH (revisto em van Asten *et al.*, 2004).

Apesar de, no presente estudo, a seroprevalência do VIH-1 ser bastante inferior à do VHC, verifica-se que a grande maioria dos indivíduos seropositivos para VIH-1 (73,9%,

17/23) possui anticorpos anti-VHC. Embora não tendo sido verificada uma associação estatisticamente significativa entre estas duas variáveis ($P>0,05$), tem sido descrita, a nível mundial, uma elevada prevalência do VHC (~90%) em UDIs infectados com VIH (revisto em Rockstroh e Spengler, 2004; revisto em Shepard *et al.*, 2005; revisto em Alter, 2006; Aceijas e Rhodes, 2007; March *et al.*, 2007). Estes dados apontam claramente para a importância da vigilância da infecção por estes dois vírus neste grupo de risco.

Apenas metade dos indivíduos do género feminino possui anticorpos anti-VHC em contraste com 2/3 dos indivíduos do género masculino. Apesar de existir uma discrepância quantitativa entre os dois géneros na população estudada, que justificará a não significância destes resultados ($P>0,05$), este padrão tem sido sistematicamente descrito em estudos de seroprevalência do VHC em UDIs (Garfein *et al.*, 1996; Marinho *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2008).

A partilha de material de injeção constitui o principal factor de risco associado à infecção por VHC em UDIs (March *et al.*, 2007). Neste estudo, este facto está bastante explícito uma vez que 97,4% dos UDIs que relataram a partilha de material de injeção possuem anticorpos anti-VHC ($P=0,00$). O facto de esta prática ter sido relatada apenas por 29,0% dos UDIs poderá estar relacionado com evidências recentes que sugerem que o risco de contaminação não reside apenas na partilha do material de injeção, mas também da restante parafernália utilizada na preparação da droga (colher, algodão, entre outros), tendo já sido descritos casos de UDIs com serologia positiva para o VHC que afirmaram nunca ter partilhado material de injeção (Crofts *et al.*, 1997). Por outro lado, sugere-se também a possibilidade da ocultação de determinados comportamentos de risco por parte dos intervenientes. Pelo contrário, a prática de relações sexuais não protegidas foi relatada pela maioria dos participantes seropositivos para o VHC, não tendo sido verificada uma associação estatisticamente significativa entre estas duas variáveis ($P>0,05$). Sendo a transmissão sexual do VHC relativamente baixa (revisto em Cavalheiro, 2007) quando comparada com a transmissão parentérica, sugere-se que a seropositividade para o VHC não esteja relacionada com a prática de relações sexuais não protegidas neste grupo de risco.

A ausência de anticorpos anti-VHC observada em 39,2% dos UDIs, para além de poder significar a ausência de contacto prévio com o vírus, poderá estar associada ao facto de

alguns indivíduos estarem no período janela quando da colheita das amostras, não havendo produção e consequentemente detecção de anticorpos anti-VHC. A produção de anticorpos anti-VHC é detectada entre 4 e 12 semanas após a infecção o que faz com que os testes baseados na pesquisa de anticorpos sejam pouco fiáveis no diagnóstico da infecção aguda (revisto em Poynard *et al.*, 2003; revisto em Chevaliez e Pawlotsky, 2006; revisto em Lemon *et al.*, 2007). Também, a imunossupressão grave (*e.g.* causada por VIH) contribui para a não detecção de anticorpos anti-VHC nos indivíduos com infecção activa (revisto em Rockstroh e Spengler, 2004; Méndez-Sánchez *et al.*, 2004). Consequentemente, a prevalência de infecção activa nesta população poderá estar subestimada. Uma vez que o RNA viral é detectado mais precocemente (revisto por Ozaras e Tahan, 2009), uma abordagem mais precisa seria a detecção de RNA viral aplicada a todas as amostras.

O facto de dispormos de apenas uma colheita por indivíduo (não permitindo a monitorização da evolução da infecção) e de não existir informação clínica adicional, não permitiu identificar a fase da infecção (aguda ou crónica) dos indivíduos seropositivos para o VHC e possuidores de RNA viral detectável. No entanto, a elevada prevalência de infecção activa (81,7%) observada sugere que os UDIs constituem, de facto, importantes portadores e potenciais disseminadores do VHC.

A ausência de detecção de RNA viral em 18,3% dos indivíduos seropositivos para o VHC, poderá estar relacionada com a resolução induzida por terapêutica (dados desconhecidos), com a resolução espontânea da infecção aguda (verificada em ~20% dos casos) (revisto em Lauer e Walker, 2001; revisto em Chen e Morgan, 2006) ou, eventualmente, com o início da fase crónica da infecção onde os níveis de RNA viral baixam acentuadamente (revisto em Blackard *et al.*, 2008). A menor prevalência de infecção activa observada nos indivíduos seropositivos para o VHC do género feminino ($P=0,02$) é concordante com o facto de as mulheres resolverem a virémia mais eficazmente do que os homens, tendo consequentemente menos probabilidade de desenvolver a forma crónica da doença. Este dado tem sido reportado por vários autores sem que tenham sido apontadas hipóteses justificativas (Thomas *et al.*, 2000; revisto em Lauer e Walker, 2001; revisto em Chen e Morgan, 2006; Blackard *et al.*, 2008). Apesar de os indivíduos co-infectados com VIH também possuírem menor taxa de resolução da virémia os dados obtidos neste estudo não confirmam esta relação ($P>0,05$) (Thomas *et al.*, 2000).

Finalmente, não obstante a execução cuidadosa dos protocolos, não podemos excluir que condições técnicas relacionadas com o manuseamento e o armazenamento do material biológico (descongelação, congelação), bem como com a amplificação por RT-PCR da região 5'UTR, possam também ter influenciado o sucesso da detecção de RNA do VHC. Ainda, apesar do elevado nível de conservação da região 5'UTR, a variabilidade genética do vírus pode ter contribuído para a ausência de amplificação de RNA viral (Simmonds, 1999; Simmonds, 2004).

Devido ao seu elevado grau de conservação e consequente facilidade de amplificação, a região 5'UTR tem sido largamente utilizada na detecção de infecção activa e determinação da carga viral (Sandres-Sauné *et al.*, 2003; Cantaloube *et al.*, 2006; Chevaliez e Pawlotsky, 2006; Franco *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2007). No entanto, esta mesma característica não permite a sua utilização para distinguir inequivocamente por análise genética alguns genótipos e subtipos do VHC (Corbet *et al.*, 2003; Laperche *et al.*, 2005; Simmonds *et al.*, 2005; Hrabec *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2007). Assim, para uma distinção rigorosa dos genótipos e subtipos do VHC, têm sido usadas por vários autores, regiões subgenómicas com maior variabilidade genética, nomeadamente as regiões C/E1 e NS5B (Simmonds *et al.*, 1993; Simmonds *et al.*, 1994; Ginabreda *et al.*, 1997; Simmonds, 1999; Kalinina *et al.*, 2002; Pybus *et al.*, 2005; Cantaloube *et al.*, 2006; Morice *et al.*, 2006; Franco *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2007; Timm *et al.*, 2007). Assim, as amostras com amplificação positiva para a região 5'UTR foram sujeitas a um protocolo de RT-PCR, sequenciação e análise filogenética, aplicado a fragmentos específicos das regiões C/E1 e NS5B.

Os *primers* desenhados, apesar do seu elevado grau de degenerescência, e as condições de amplificação optimizadas permitiram a amplificação dos fragmentos alvo em todas as amostras. A ausência de inespecificidade e a quantidade de produto obtido permitiram a sequenciação directa de ambas as regiões em praticamente todas as amostras. Este resultado demonstra a adequação destas condições de amplificação e a sua aplicabilidade noutros estudos de epidemiologia molecular do VHC.

A análise filogenética baseada nas sequências nucleotídicas das regiões C/E1 e NS5B, permitiu construir árvores filogenéticas com elevado grau de certeza relativamente aos agrupamentos formados e, consequentemente, um elevado grau de fiabilidade na subtipagem. No seguimento da demonstração do posicionamento equivalente das sequências nas árvores referentes às regiões individuais, construímos árvores com base na concatenação das

sequências das duas regiões. A utilização da concatenação de sequências, pouco frequente para o VHC, aumentou ainda mais o grau de certeza das inferências filogenéticas, estando este facto relacionado com o maior número de nucleótidos analisados, traduzido em valores de *bootstrap* mais elevados. Apesar da vantagem da utilização de sequências concatenadas, salienta-se que este facto só é possível quando existem disponíveis nas bases de dados sequências de genoma completo ou das regiões subgenómicas analisadas. Excepcionalmente, foram encontradas nas bases de dados, quatro sequências do VHC de genótipo 4, provenientes de um estudo semelhante (Morice *et al.*, 2001), referentes às regiões C/E1 e NS5B, tendo sido feita a respectiva concatenação.

A análise filogenética efectuada demonstrou que, para as regiões C/E1 e NS5B, as estirpes do VHC circulantes na população de UDIs em causa, pertencem aos subtipos 1a (49,2%), 1b (6,0%), 3a (22,4%), 4a (13,4%), e 4d (9,0%), indicando que o subtipo 1a é responsável pela maioria das infecções por VHC, seguido dos subtipos 3a, 4a e 4d. A presença dos genótipos 1, 3 e 4 e a ausência dos genótipos 2, 5 e 6 circulantes nesta população de UDIs é concordante com a distribuição dos genótipos descrita recentemente nos UDIs da Europa (van Asten *et al.*, 2004; Simmonds, 2004; Araújo *et al.*, 2005; Echevarría *et al.*, 2006; Katsoulidou *et al.*, 2006; Sereno *et al.*, 2009).

A elevada prevalência dos subtipos 1a e 3a (71,6%) observada tem sido largamente descrita nos UDIs dos países industrializados, nomeadamente nos EUA e Europa, reforçando a forte associação entre estes dois subtipos e o uso de drogas injectáveis (Pawlotsky *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1997; Simmonds, 2001; Martial *et al.*, 2004; Simmonds, 2004; Echevarría *et al.*, 2006; Sereno *et al.*, 2009). Relativamente a Portugal, não existem dados relativos aos UDIs. No entanto, estudos dispersos de genotipagem/subtipagem, não baseados em análise filogenética e realizados em diferentes grupos populacionais (dadores de sangue, hemodialisados, transplantados), indicam a circulação destes subtipos. À semelhança dos nossos resultados, constata-se no conjunto destes estudos nacionais uma maior prevalência do subtipo 1a relativamente ao subtipo 3a (de Carvalho *et al.*, 2000; Ramalho *et al.*, 2000; Gameiro *et al.*, 2001; Araújo *et al.*, 2005; Caldeira *et al.*, 2007). Curiosamente, a proporção relativa destes dois subtipos surge invertida noutros estudos europeus, onde o subtipo 3a é responsável pela maioria das infecções nos UDIs (Pawlotsky *et al.*, 1995; Haushofer *et al.*, 2001; Katsoulidou *et al.*, 2006; Sereno *et al.*, 2009). Porém, não podemos ser alheios ao

número limitado de amostras analisadas neste estudo ($n = 67$) comparativamente com os estudos anteriormente referidos.

A existência de apenas quatro UDIs infectados com o subtipo 1b está de acordo com a baixa prevalência deste subtipo descrita para este grupo de risco, reflectindo a sua associação com outras vias de transmissão, nomeadamente, a prática de transfusões sanguíneas no passado (Pawlotsky *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1997; Ramalho *et al.*, 2000; Haushofer *et al.*, 2001; Simmonds, 2001; Martial *et al.*, 2004; Simmonds, 2004; Echevarría *et al.*, 2006; Caldeira *et al.*, 2007; Sereno *et al.*, 2009). O subtipo 1b parece estar igualmente associado a indivíduos de idade mais avançada comparativamente com os subtipos 1a e 3a, reflectindo uma infecção longínqua associada a práticas clínicas sem controlo do VHC (Pawlotsky *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1997; Haushofer *et al.*, 2001; Martial *et al.*, 2004; Simmonds, 2004). A amostragem referente a este subtipo sendo bastante reduzida ($n = 4$), provavelmente contribuiu para a não confirmação desta associação ($P > 0,05$). Por outro lado, uma vez que o inquérito epidemiológico não contemplou informação relativa à prática de transfusões sanguíneas, fica por averiguar se os indivíduos infectados com o subtipo 1b contraíram o VHC através da utilização de drogas injectáveis ou através de transfusões sanguíneas.

Ao contrário dos genótipos 1 e 3 amplamente distribuídos nos UDIs da Europa, o genótipo 4 afecta tipicamente populações em África e no Médio Oriente (principalmente Egipto), sendo pouco comum na Europa (Shobokshi *et al.*, 2003; Ray *et al.*, 2000; Kamal e Nasser, 2008). Recentemente, tem-se verificado uma crescente disseminação do genótipo 4, associada principalmente ao uso de drogas injectáveis, co-infecção VHC-VIH e imigração, em alguns países do Sul da Europa, designadamente Itália (Argentini *et al.*, 2000; Sereno *et al.*, 2009), Grécia (Katsoulidou *et al.*, 2006), França (Morice *et al.*, 2001; Nicot *et al.*, 2005) e Espanha (van Asten *et al.*, 2004; Echevarría *et al.*, 2006; Fernández-Arcás *et al.*, 2006; Franco *et al.*, 2007).

O presente estudo descreve pela primeira vez a circulação do genótipo 4 em UDIs de Portugal à semelhança do observado noutros países do Sul da Europa, salientando-se a elevada prevalência (22,4%) próxima das taxas mais elevadas (10-24%) descritas para aquela região (Argentini *et al.*, 2000; Morice *et al.*, 2001; van Asten *et al.*, 2004; Nicot *et al.*, 2005; Katsoulidou *et al.*, 2006; Echevarría *et al.*, 2006; Fernández-Arcás *et al.*, 2006; Franco *et al.*, 2007; Sereno *et al.*, 2009). Ainda, o facto de a maioria dos indivíduos com VIH-1 estar co-infectada com o genótipo 4 vem de encontro à associação do uso de drogas injectáveis e co-

infecção com VIH com a crescente disseminação do genótipo 4 na Europa. De facto, o genótipo 4 (subtipo 4a) é responsável pela maioria das infecções nos indivíduos deste estudo co-infectados com o VIH-1 ($P=0,003$).

Em Portugal, a circulação do genótipo 4 foi descrita em menor prevalência em dois estudos de genotipagem anteriores. Um destes, incluiu amostras do Norte do país, colhidas entre 1996 e 2004, tendo sido estimada uma prevalência de 8,58% (303/3532) mas sem dados sócio-demográficos (Araújo *et al.*, 2005). O segundo estudo englobou amostras de doadores de sangue, colhidas entre 2000 e 2006, tendo-se encontrado 7,8% (6/76) infectadas com o genótipo 4 (Caldeira *et al.*, 2007).

A distribuição dos subtipos do genótipo 4 mostra infecção em proporções relativamente semelhantes com os subtipos 4a e 4d, que são igualmente os principais subtipos do genótipo 4 encontrados nos UDIs do Sul da Europa não obstante diferenças nas proporções relativas em termos geográficos. Assim, enquanto que em Itália (Serenio *et al.*, 2009) e Espanha (van Asten *et al.*, 2004; Fernández-Arcás *et al.*, 2006) se observa quase exclusivamente o subtipo 4d, em França (Morice *et al.*, 2001; Nicot *et al.*, 2005), à semelhança da população de UDIs estudada, são observados ambos os subtipos em proporções idênticas.

Em quase todos os subtipos do VHC foi verificada uma elevada dominância de indivíduos do género masculino (1a, 90,9%; 1b, 100%; 4a, 88,9%; 4d, 83,3%), que reflecte as prevalências de género da população estudada. No entanto, para o subtipo 3a, a distribuição entre os dois géneros é relativamente semelhante (53,3% para o género masculino e 46,7% para o género feminino), tendo como consequência uma prevalência significativamente maior do subtipo 3a no género feminino ($P=0,02$). Uma vez que dispomos de um número reduzido de indivíduos do género feminino e que esta associação não foi encontrada na literatura, este resultado deverá ser cuidadosamente confirmado através de um estudo mais alargado com inclusão de um maior número indivíduos do género feminino.

Para obter um perfil epidemiológico mais detalhado dos genótipos 1, 3 e 4 e poder tentativamente inferir sobre a origem dos vírus circulantes nesta população, procedemos à construção de árvores para genótipos individuais tentando usar sequências de referência provenientes de indivíduos com características epidemiológicas semelhantes, designadamente, grupo de risco. Esta tarefa foi limitada pela existência nas bases de dados de um reduzido

número de sequências de UDIs infectados com estes 3 genótipos e compatíveis com o fragmento subgenómico analisado (Kuiken *et al.*, 2008). Assim, para o genótipo 1 foi possível comparar apenas as sequências dos UDIs da população estudada com estirpes do VHC a circular na população em geral. Para os restantes genótipos foi possível a introdução de estirpes do VHC circulantes em UDIs, embora em número reduzido.

Relativamente ao genótipo 1, a análise filogenética mostrou a segregação de dois grandes grupos de sequências dentro do subtipo 1a (*bootstrap*>75%) sugestiva de, pelo menos, dois eventos independentes de introdução deste subtipo nesta população. A dispersão de sequências de outras regiões geográficas, inclusivamente dos EUA, no seio das sequências portuguesas demonstra a circulação aberta deste subtipo entre diferentes países. Apesar deste padrão disperso, foram observados pequenos subgrupos constituídos exclusivamente por sequências de isolados nacionais, indicando a existência de estirpes epidemiologicamente relacionadas, possivelmente através de transmissão em comunidades locais. Este facto é suportado por estudos comportamentais que descrevem que a partilha de material de injeção entre UDIs é bastante mais frequente entre indivíduos socialmente relacionados do que entre estranhos (Peters *et al.*, 1998 citado em Cochrane *et al.*, 2002).

O número reduzido de estirpes do VHC do subtipo 1b ($n = 4$) na população estudada não permitiu inferir de forma rigorosa as respectivas relações filogenéticas. Verifica-se, no entanto, a dispersão das sequências portuguesas entre as sequências de diferentes regiões geográficas, reflectindo a ampla distribuição mundial deste subtipo relacionada com intervenções médicas de larga escala no passado (Smith *et al.*, 1997; Simmonds, 2004). Duas das sequências formam entre si um grupo suportado por um valor de *bootstrap* de 100%, sugerindo serem provenientes de indivíduos epidemiologicamente relacionados.

A análise das relações entre as sequências do subtipo 3a demonstrou uma total mistura filogenética das sequências de UDIs circulantes em Portugal e das sequências de UDIs provenientes de regiões geográficas muito diversas, incluindo Brasil, França e Estónia. Este padrão foi igualmente descrito noutros estudos de epidemiologia molecular do subtipo 3a e suporta uma epidemia em larga escala entre os UDIs dos países industrializados, provavelmente resultado de uma única introdução seguida de uma rápida disseminação na população e, em particular, nas comunidades de UDIs (Pybus *et al.*, 2005; Morice *et al.*,

2006). Segundo vários autores, a rápida disseminação do subtipo 3a nos UDIs coincide com a introdução de novos factores de risco para o VHC nos anos 1960-1970, nomeadamente a expansão do consumo de drogas e a consequente partilha de material de injeção (Pawlotsky *et al.*, 1995; Simmonds, 2001).

O padrão da árvore filogenética correspondente ao genótipo 4 mostra um agrupamento robusto (valor de *bootstrap* de 100%) de todas as sequências do subtipo 4a. Este conjunto de sequências inclui, para além das sequências nacionais, sequências de UDIs europeus e dos EUA e ainda isolados virais do Egipto. Considerando que o subtipo 4a é endémico no Egipto podemos sugerir, à semelhança de outros autores (Morice *et al.*, 2001) uma estirpe viral egípcia como ancestral comum do VHC do subtipo 4a circulante a nível global entre UDIs. Uma vez que as sequências nacionais e europeias de UDIs se agrupam com um valor de *bootstrap* significativo (88%), poderemos colocar a hipótese de um efeito fundador a nível dos UDIs europeus, embora limitada pelo reduzido número de sequências europeias usadas na árvore. Ainda, observámos que as estirpes do VHC circulantes no Egipto são bastante mais heterogêneas e distantes entre si ($d=0,097$) do que as estirpes que circulam em Portugal, Espanha e França, estas últimas caracterizadas por um elevado grau de homogeneidade ($d=0,060$). Esta diferença entre as distâncias genéticas indica também que as estirpes do VHC do subtipo 4a circulam há mais tempo no Egipto do que nos UDIs europeus, suportando a introdução relativamente recente deste subtipo nos UDIs da Europa, sugerida também por outros autores (Morice *et al.*, 2001; van Asten *et al.*, 2004; Nicot *et al.*, 2005; Echevarría *et al.*, 2006; Fernández-Arcás *et al.*, 2006; Kamal e Nasser, 2008).

O padrão filogenético das sequências do subtipo 4d é análogo ao do subtipo 4a. No entanto, o limitado número de sequências disponíveis nas bases de dados para usar como referência, não permitiu inferir sobre a origem dos vírus deste subtipo circulantes nos UDIs de Portugal. O baixo valor da distância genética estimado para as estirpes nacionais do subtipo 4d demonstra, à semelhança do 4a, uma introdução recente, sendo este resultado igualmente reportado em UDIs de outros países do Sul da Europa (Morice *et al.*, 2001; van Asten *et al.*, 2004; Nicot *et al.*, 2005; Fernández-Arcás *et al.*, 2006). A homogeneidade genética verificada para as estirpes nacionais do subtipo 4a e 4d, reflectida nos baixos valores das distâncias genéticas, sugere que as introduções recentes apontadas para estes subtipos tenham sido em número limitado. Os resultados obtidos para o genótipo 4 ($\sim 0,06$ para C/E1 e $\sim 0,04$ para

NS5B) contrastam com os dos genótipos 1 e 3, para os quais foram observadas distâncias genéticas claramente superiores ($\sim 0,100$, para C/E1 e $\sim 0,06$, para NS5B), indicando que estes últimos genótipos circulam há mais tempo neste grupo de risco. Por outro lado, o tempo de circulação dos diferentes subtipos na população estudada, deverá também reflectir as respectivas prevalências obtidas. Genericamente, a análise filogenética conduzida demonstrou a existência de um padrão epidemiológico, caracterizado pela existência de múltiplos genótipos representados por poucos subtipos, comum às populações de UDIs dos países industrializados e consistente com introduções relativamente recentes e limitadas a partir de áreas endémicas, nomeadamente, de populações ancestrais em África e Ásia (Smith *et al.*, 1997).

De um modo geral, os estudos de genotipagem/subtipagem do VHC baseiam-se na análise de uma única região subgenómica de dimensões reduzidas, assumindo-se que a região analisada é representativa da totalidade do genoma, não contemplando fenómenos de recombinação (Simmonds, 1999). Apesar de este evento ser raro no VHC, já foram identificados alguns vírus recombinantes (Kalinina *et al.*, 2002; Colina *et al.*, 2004; Kageyama *et al.*, 2006; Moreau *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2006; Nopporpanth *et al.*, 2006; Legrand-Abravanel *et al.*, 2007; Ross *et al.*, 2008; Sentandreu *et al.*, 2008). Ainda que o método mais rigoroso de identificação de recombinantes seja a sequenciação do genoma completo, na impossibilidade de o fazer recorre-se frequentemente à análise de várias regiões subgenómicas. Assim, na escolha das regiões a subtipar (C/E1 e NS5B) foram considerados os pontos de recombinação anteriormente identificados nas estirpes recombinantes. A concordância total relativamente à subtipagem obtida para as duas regiões analisadas, juntamente com o facto de não existirem ramos na árvore com comprimento indicador de elevada divergência genética, sugere a ausência de estirpes do VHC recombinantes a circular nesta população, o que está de acordo com a baixa frequência de recombinação observada para o VHC.

Este estudo demonstrou pela primeira vez que a actual epidemia dos subtipos 1a e 3a observada entre UDIs da Europa afecta igualmente os UDIs de Portugal. Recentemente, o genótipo 4, em particular 4a e 4d, relacionado com o consumo de drogas injectáveis, tem sido também reportado em alguns países do Sul da Europa. Em Portugal, o genótipo 4 apresenta

das taxas mais elevadas descritas para as populações de UDIs europeias (22,4%), reflectindo a sua rápida disseminação nesta população de risco.

Tendo em conta 1) que o genótipo do VHC é um dos parâmetros determinantes de uma resposta virológica sustentada aos tratamentos actualmente disponíveis sendo consequentemente decisivo para a selecção de um regime terapêutico adequado; 2) que os genótipos 1 e 4 apresentam a menor taxa de resposta; 3) a elevada prevalência destes dois genótipos (77,6%) na população de UDIs analisada; e 4) que o VHC que infecta este grupo de risco pode ser transmitido para a população em geral, Portugal parece apresentar um cenário preocupante no que diz respeito à infecção por VHC. Assim, pensamos serem necessários mais estudos de epidemiologia molecular com um carácter mais abrangente, de modo a obter uma melhor avaliação e monitorização da disseminação do VHC em Portugal.

5. Referências Bibliográficas

Aceijas, C. e Rhodes, T. 2007. Global estimates of prevalence of HCV infection among injecting drug users. *International Journal of Drug Policy* 18: 352-358.

Alter, M.J. 2002. Prevention of spread of hepatitis C. *Journal of Hepatology* 36:S93-98.

Alter, M.J. 2006. Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection. *Journal of Hepatology* 44:S6-9.

Araújo, F., Henriques, I., Monteiro, F., Meireles, E., Cruz, A., Tavares, G. e Mota-Miranda A. 2005. Evaluation of NucliSens-AmpliScreen methodology to detect subtypes G of HIV-1 and 4c/4d of HCV in the screening of blood donors. *Transfusion clinique et biologique* 12:331-335.

Argentini, C., Dettori, S., Villano, U., Guadagnino, V., Infantolino, D., Denticò, P., Coppola, R.C. e Rapicetta, M. 2000. Molecular characterisation of HCV genotype 4 isolates circulating in Italy. *Journal of Medical Virology* 62:84-90.

van Asten, L., Verhaest, I., Lamzira, S., Hernandez-Aguado, I., Zangerle, R., Boufassa, F., Rezza, G., Broers, B., Robertson, J.R., Brettle, R.P., McMenamin, J., Prins, M., Cochrane, A., Simmonds, P., Coutinho, R.A. e Bruisten, S. 2004. Spread of hepatitis C virus among European injection drug users infected with HIV: a phylogenetic analysis. *The Journal of Infectious Diseases* 189:292-302.

Augusto, F e Lobato, C. 2003. Hepatite C. *In* Hepatites Víricas (J. Cotter ed), pp 99-122, Núcleo de Gastreenterologia dos Hospitais Distritais (NGHD).

Bartenschlager, R. e Lohmann, V. 2000. Replication of the hepatitis C virus. *Baillière's best practice & research. Clinical gastroenterology.* 14:241-254.

Birnboim, H.C. e Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7:1513-1523.

- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C. e Rouillé, Y.** 2006. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology* 80:6964-6972.
- Blackard, J.T., Shata, M.T., Shire, N.J. e Sherman KE.** 2008. Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem. *Hepatology* 47:321-331.
- de Bruijne, J., Weegink, C.J., Jansen, P.L. e Reesink, H.W.** 2009. New developments in the antiviral treatment of hepatitis C. *Vox Sanguinis* 97:1-12.
- Caldeira, M.R., Teixeira, M.J.N., Henggeler, F.J.F.C., Mateus, N.F., Diniz, R.C.A. e Gonçalves, M.H.** 2007. Hepatitis C Virus genotype prevalence among blood donors from Central Portugal. Poster session: 6.2 Blood Safety- Transfusion Transmitted Disease- Hepatitis. XVIIth Regional Congress of the ISBT, Europe.
- Cantaloube, J., Gallian, P., Laperche, S., Elghouzzi, M., Piquet, Y., Bouchardeau, F., Jordier, F., Biagini, P., Attoui, H. e Micco, P.** 2006. Molecular Characterization of Genotype 2 and 4 Hepatitis C virus Isolates in French Blood Donors. *Journal of Medical Virology* 80: 1732-1739.
- de Carvalho, A., Martinho, A., Leitão, J., Cipriano, M.A., Coimbra, H. e Porto, A.** 2000. HCV genotypes. Liver histopathology and immunologic profile in four groups of patients. *Acta Médica Portuguesa* 13:67-75.
- Cavalheiro, P.** 2007. Sexual Transmission of Hepatitis C. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 4:271-277.
- Chen, S. L. e Morgan, T.R.** 2006. The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *International Journal of Medical Sciences* 3:47-52.
- Chevaliez, S. e Pawlotsky, J.M.** 2006. Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. *International Journal of Medical Sciences* 3: 35-40.

Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W. e Houghton, M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362.

Cochrane, A., Searle, B., Hardie, A., Robertson, R., Delahooke, T., Cameron, S., Tedder, R.S., Dusheiko, G.M., De Lamballerie, X. e Simmonds, P. 2002. A genetic analysis of hepatitis C virus transmission between injection drug users. *The Journal of Infectious Diseases* 186:1212-1221.

Colina, R., Casane, D., Vasquez, S., Aguirre, L.G., Chunga, A., Romero, H., Khan, B. e Cristina, J. 2004. Evidence of intratypic recombination in natural populations of hepatitis C virus. *Journal of General Virology* 85:31-37.

Corbet, S., Bukh, J., Heinsen, A. e Fomsgaard, A. 2003. Hepatitis C Virus Subtyping by a Core-Envelope 1- Based Reverse Transcriptase PCR assay with Sequencing and its use in determining subtype distribution among Danish patients. *Journal of Clinical Microbiology* 41 No 3:1091-1100.

Crofts, N., Jolley, D., Kaldor, J., van Beek, I. e Wodak, A. 1997. Epidemiology of hepatitis C virus infection among injecting drug users in Australia. *J Epidemiol Community Health* 51:692-697.

Dallal, G.E. 2007. Significance tests. Version 8, August 2007. <http://www.jerrydallal.com/LHSP/pval.htm> in *The Little Handbook of Statistical Practice*, <http://www.jerrydallal.com/LHSP/LHSP.HTM>.

Domingo, E., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Martín-Hernández, A.M., Sáiz, J.C. e Escarmís C. 1998. Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerging Infectious Diseases* 4:521-527.

Dubuisson, J. 2007. Hepatitis C virus proteins. *World Journal of Gastroenterology* 13:2406-2415.

Echevarría, J.M., León, P., Pozo, F. e Avellón, A. 2006. Follow-up of the prevalence of hepatitis C virus genotypes in Spain during a nine-year period (1996-2004). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 24:20-25.

Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D. e Bienz K. 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *Journal of Virology* 76:5974-5984.

EMCCDA (The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction). Statistical bulletin 2008. Drug-related infectious diseases (INF)- Prevalence of HIV, HCV and HBV in IDUs. Disponível em: <http://www.emcdda.europa.eu/stats08/inf>.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

Fernández-Arcás, N., López-Siles, J., Trapero, S., Ferraro, A., Ibáñez, A., Orihuela, F., Maldonado, J. e Alonso, A. 2006. High prevalence of hepatitis C virus subtypes 4c and 4d in Malaga (Spain): phylogenetic and epidemiological analyses. *Journal of Medical Virology* 78:1429-35.

Ferreira, W.F.C. e Gameiro, R. 2002. Vírus das Hepatites. *In* Microbiologia – Volume 3 (W.F.C. Ferreira e J.C.F. Sousa eds), pp 334-337, Lidel, Lisboa.

Franco, S., Tural, C., Clotet, B. e Martínez, M.A. 2007. Complete nucleotide sequence of genotype 4 hepatitis C viruses isolated from patients co-infected with human immunodeficiency virus type 1. *Virus Research* 123:161-169.

Gameiro, R., Venneno, T., Prieto, E., Castro, R., Carnall, V., Canas-Ferreira, W. e Exposto F. 2001. Vaginal shedding of hepatitis C virus. *International Journal of STD and AIDS* 12:717-21.

Garfein, R.S., Vlahov, D., Galai, N., Doherty, M.C. e Nelson, K.E. 1996. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. *American Journal of Public Health* 86:655-61.

Ginabreda, M.G., Yoshida, C.F. e Niel, C. 1997. Genomic characterization of Brazilian hepatitis C virus genotypes 1a and 1b. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 30:339-45.

Griffin, S., Stgelais, C., Owsianka, A.M., Patel, A.H., Rowlands, D. e Harris, M. 2008. Genotype-dependent sensitivity of hepatitis C virus to inhibitors of the p7 ion channel. *Hepatology* 48:1779-1790.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.

Haushofer, A.C., Koptý, C., Hauer, R., Brunner, H. e Halbmayer, W.M. 2001. HCV genotypes and age distribution in patients of Vienna and surrounding areas. *Journal of Clinical Virology* 20:41-47.

Higgs, P.G. e Attwood, T.K. 2005. Phylogenetic methods. *In* *Bioinformatics and Molecular Evolution* (P.G. Higgs e T.K. Attwood eds), pp169- 170, Blackwell Publishing, England.

Hraber, P.T., Fischer, W., Bruno, W.J., Leitner, T. e Kuiken, C. 2006. Comparative analysis of hepatitis C virus phylogenies from coding and non-coding regions: the 5'untranslated region (UTR) fails to classify subtypes. *Virology Journal* 3: 103.

Kageyama, S., Agdamag, D.M., Alesna, E.T., Leño, P.S., Heredia, A.M., Abellanos-Tac-An, I.P., Jereza, L.D., Tanimoto, T., Yamamura, J. e Ichimura, H. 2006. A natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant of hepatitis C virus in the Philippines. *Journal of Medical Virology* 78:1423-8.

Kalinina, O., Norder, H., Mukomolov, S. e Emagnius, L.O. 2002. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *The Journal of Virology* 76:4034-4043.

Kamal, S.M. e Nasser, I.A. 2008. Hepatitis C genotype 4: What we know and what we don't yet know. *Hepatology* 47:1371-1383.

Katsoulidou, A., Sypsa, V., Tassopoulos, N.C., Boletis, J., Karafoulidou, A., Ketikoglou, I., Tsantoulas, D., Vafiadi, I., Hatzis, G., Skoutelis, A., Akriviadis, E., Vasiliadis, T., Kitis, G., Magiorkinis, G. e Hatzakis A. 2006. Molecular epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in Greece: temporal trends in HCV genotype-specific incidence and molecular characterization of genotype 4 isolates. *Journal of viral hepatitis* 13:19-27.

Kirkman, T.W. 1996. Statistists to Use. <http://www.physics.csbsju.edu/stats/> in Tools for Science, <http://www.physics.csbsju.edu/>.

Kuiken, C., Hraber, P., Thurmond, J. e Yusim, K. 2008. The Hepatitis C sequence database in Los Alamos. *Nucleic Acids Research* D512-516. Disponível em: <http://hcv.lanl.gov>.

Laperche, S., Lunel, F., Izopet, J., Alain, S., Dény, P., Duverlie, G., Gaudy, C., Pawlotsky, J.M., Plantier, J.C., Pozzetto, B., Thibault, V., Tosetti, F. e Lefrère, J.J. 2005. Comparison of hepatitis C virus NS5b and 5' noncoding gene sequencing methods in a multicenter study. *Journal of Clinical Microbiology* 43:733-739.

Lauer, G.M. e Walker, B.D. 2001. Hepatitis C virus infection. *The New England Journal of Medicine* 345:41-52.

Lavanchy, D. 2008. Chronic viral hepatitis as a public health issue in the world. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology* 22:991-1008.

Lavanchy, D. 2009. The global burden of hepatitis C. *Liver International* 29:74-81.

- Lee, K.C., Lim, W.W. e Lee, S.S.** 2008. High prevalence of HCV in a cohort of injectors on methadone substitution treatment. *Journal of Clinical Virology* 41:297-300.
- Legrand-Abravanel, F., Claudinon, J., Nicot, F., Dubois, M., Chapuy-Regaud, S., Sandres-Saune, K., Pasquier, C. e Izopet J.** 2007. New natural intergenotypic (2/5) recombinant of hepatitis C virus. *Journal of Virology* 81:4357-4362.
- Lemon, S.M., Walker, C., Alter, M.J. e Yi, M.** 2007. Hepatitis C Virus. *In* *Fields Virology – Volume one* (D.M. Knipe, P.M. Howley eds), 5^a ed., pp 1253-1304, Lippincott Williams & Wilkins, USA.
- Lindenbach, B.D. e Rice, C.M.** 2005. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 436:933-938.
- MacParland, S.A., Pham, T.N., Guy, C.S. e Michalak, T.I.** 2009. Hepatitis C virus persisting after clinically apparent sustained virological response to antiviral therapy retains infectivity in vitro. *Hepatology* 49:1431-1441.
- March, J.C., Oviedo-Joekes, E. e Romero, M.** 2007. Factors associated with reported hepatitis C and HIV among injecting drug users in ten European cities. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 25:91-97.
- Marinho, R.T., Moura, M.C., Gíria, J.A. e Ferrinho, P.** 2001. Epidemiological aspects of Hepatitis C in Portugal. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 16:1076-1077.
- Marinho, R.T. e Macedo, G.** 2009. Guia prático da Hepatite C. Associação Portuguesa para o Estudo do Fígado (APEF). Disponível em: www.apef.com.pt.
- Martial, J., Morice, Y., Abel, S., Cabié, A., Rat, C., Lombard, F., Edouard, A., Pierre-Louis, S., Garsaud, P., Béra, O., Chout, R., Gordien, E., Deny, P. e Césaire, R.** 2004. Hepatitis C virus (HCV) genotypes in the Caribbean island of Martinique: evidence for a large radiation of HCV-2 and for a recent introduction from Europe of HCV-4. *Journal of Clinical Microbiology* 42:784-971.

Mathei, C., Buntinx, F. e Van Damme, P. 2002. Seroprevalence of hepatitis C markers among intravenous drug users in western European countries: a systematic review. *Jornal of Viral Hepatitis* 9:157-173.

Matthews-Greer, J. M., Caldito, G.C., Adley, S.D., Willis, R., Mire, A.C., Jamison, R.M., McRae, K.L., King, J.W. e Chang, W.L. 2001. Comparison of Hepatitis C Viral Loads in Patients with or without Human Immunodeficiency Virus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8, No.4:690-694.

Méndez-Sánchez, N., Motola-Kuba, D., Chavez-Tapia, N.C., Bahena, J., Correa-Rotter, R. e Uribe, M. 2004. Prevalence of hepatitis C virus infection among hemodialysis patients at a tertiary-care hospital in Mexico City, Mexico. *Journal of Clinical Virology* 42:4321-4322.

Moradpour, D., Penin, F. e Rice, C.M. 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews Microbiology* 5:453-463.

Moreau, I., Hegarty, S., Levis, J., Sheehy, P., Crosbie, O., Kenny-Walsh, E. e Fanning, L.J. 2006. Serendipitous identification of natural intergenotypic recombinants of hepatitis C in Ireland. *Virology Journal* 3:95.

Moreno, M.P., Casane, D., López, L. e Cristina, J. 2006. Evidence of recombination in quasispecies populations of a Hepatitis C Virus patient undergoing anti-viral therapy. *Virology Journal* 3:87.

Morice, Y., Roulot, D., Grando, V., Stirnemann, J., Gault, E., Jeantils, V., Bentata, M., Jarrousse, B., Lortholary, O., Pallier, C. e Dény, P. 2001. Phylogenetic analyses confirm the high prevalence of hepatitis C virus (HCV) type 4 in the Seine-Saint-Denis district (France) and indicate seven different HCV-4 subtypes linked to two different epidemiological patterns. *Journal of General Virology* 82:1001-1012.

Morice, Y., Cantaloube, J., Beaucourt, S., Barbotte, L., Gendt, S. D., Goncales, F.L., Butterworth, L., Cooksley, G., Gish, R.G., Beaugrand, M., Fay, O., Gonzalez, J.E., Martins, R.M.B., Dhumeaux, D., Vanderborght, B., Stuyver, L., Sablon, E., Lamballerie, X. e Pawlotsky, J.M. 2006. Molecular Epidemiology of Hepatitis C Virus Subtype 3a in Injecting Drug Users. *Journal of Medical Virology* 78: 1296-1303.

Murphy, D.G., Willems, B., Deschênes, M., Hilzenrat, N., Mousseau, R. e Sabbah, S. 2007. Use of Sequence Analysis of the NS5B Region for Routine Genotyping of Hepatitis C Virus with Reference to C/E1 and 5' Untranslated Region Sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 45 No.4: 1102-1112.

Nicot, F., Legrand-Abravanel, F., Sandres-Saune, K., Boulestin, A., Dubois, M., Alric, L., Vinel, J., Pasquier, C. e Izopet, J. 2005. Heterogeneity of hepatitis C virus genotype 4 strains circulating in south-western France. *Journal of General Virology* 86:107-114.

Noppornpanth, S., Lien, T.X., Poovorawan, Y., Smits, S.L., Osterhaus, A.D. e Haagmans, B.L. 2006. Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus. *Journal of Virology* 80:7569-7577.

OEDT (Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência). Relatório Anual 2004. A evolução do fenómeno da droga na União Europeia e na Noruega. 2004. Cap.7 – Tratamento-Responder às necessidades das pessoas em dificuldade, p.66. Disponível em: <http://ar2004.emcdda.europa.eu/pt/home-pt.html>.

Ozaras, R. e Tahan, V. 2009. Acute hepatitis C: prevention and treatment. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 7:351-361.

Pavlović, D., Neville, D.C., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R.A., Fischer, W.B. e Zitzmann, N. 2003. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 100:6104-6108.

- Pawlotsky, J.M., Tsakiris, L., Roudot-Thoraval, F., Pellet, C., Stuyver, L., Duval, J. e Dhumeaux D.** 1995. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *The Journal of infectious diseases* 171:1607-1610.
- Pawlotsky, J.M.** 2006. Therapy of hepatitis C: from empiricism to eradication. *Hepatology* 43:207-220.
- Pawlotsky, J.M., Chevaliez, S. e McHutchison, J.G.** 2007. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* 132:1979-98.
- Peters A, Davies T, Richardson A.** 1998. Multi-site samples of injecting drug users in Edinburgh: prevalence and correlates of risky injecting practices. *Addiction* 93:253-67.
- Poynard, T., Yuen, M.F., Ratziu, V. e Lai, C.L.** 2003. Viral hepatitis C. *Lancet* 362:2095-2100.
- Pybus, O. G., Charleston, M.A., Gupta, S., Rambaut, A., Holmes, E.C. e Harvey, P.H.** 2001. The Epidemic behaviour of the Hepatitis C Virus. *Science* 292: 2323-2325.
- Pybus, O.G., Cochrane, A., Holmes, E.C. e Simmonds, P.** 2005. The hepatitis C virus epidemic among injecting drug users. *Infection, Genetics and Evolution* 5:131-139.
- Pybus, O.G., Barnes, E., Taggart, R., Lemey, P., Markov, P.V., Rasachak, B., Syhavong, B., Phetsouvanah, R., Sheridan, I., Humphreys, I.S., Lu, L., Newton, P.N. e Klenerman, P.** 2009. Genetic History of Hepatitis C Virus in East Asia. *Journal of Virology* 83:1071-1082.
- Ramalho, F., Costa, A., Pires, A., Cabrita, P., Serejo, F., Correia, A.P., Fatela, N., Clória, H., Lopes, J., Pinto, H.C., Marinho, R., Raimundo, M., Velosa, J., Batista, A. e Moura, M.C.** 2000. Correlation of genotypes and route of transmission with histologic activity and disease stage in chronic hepatitis C. *Digestive Diseases and Sciences* 45 No 1:182-7.

- Ray, S.C., Arthur, R.R., Carella, A., Bukh, J. e Thomas, D.L.** 2000. Genetic epidemiology of hepatitis C virus throughout Egypt. *The Journal of infectious diseases* 182:698-707.
- Rockstroh, J.K. e Spengler, U.** 2004. HIV and hepatitis C virus co-infection. *The Lancet Infectious Diseases* 4:437-444.
- Ross, R.S., Verbeeck, J., Viazov, S., Lemey, P., Van Ranst, M. e Roggendorf M.** 2008. Evidence for a Complex Mosaic Genome Pattern in a Full-length Hepatitis C Virus Sequence. *Evolutionary Bioinformatics Online* 4:249-254.
- Sabahi A.** 2009. Hepatitis C Virus entry: the early steps in the viral replication cycle. *Virology Journal* 6:117.
- Sandres-Sauné K., Deny, P., Pasquier, C., Thibaut, V., Duverlie, G. e Izopet, J.** 2003. Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. *Journal of Virological Methods* 109:187-193.
- Scheinmann, R., Hagan, H., Lelutiu-Weinberger, C., Stern, R., Des Jarlais, D.C., Flom, P.L. e Strauss, S.** 2007. Non-Injection Drug Use and Hepatitis C Virus : A Systematic Review. *Drug Alcohol Depend* 89:1-12.
- Sereno, S., Perinelli, P. e Laghi, V.** 2009. Changes in the prevalence of hepatitis C virus genotype among Italian injection drug users-relation to period of injection started. *Journal of Clinical Virology* 45:354-357.
- Sentandreu, V., Jiménez-Hernández, N., Torres-Puente, M., Bracho, M.A., Valero, A., Gosalbes, M.J., Ortega, E., Moya, A. e González-Candelas, F.** 2008. Evidence of recombination in inpatient populations of hepatitis C virus. *PLoS One* 3:e3239.
- Shepard, C.W., Finelli, L. e Alter, M.J.** 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infectious Diseases* 5:558-67.

Shobokshi, O.A., Serebour, F.E. e Skakni L.I. 2003. Hepatitis C genotypes/subtypes among chronic hepatitis patients in Saudi Arabia. *Saudi Medical Journal* 24:87-91.

Silveira, J.P.M., Pádua, J.M. e Catita, P. 2004. Os utentes do Centro de Atendimento a Toxicodependentes de Xabregas e a sua passagem pelo sistema judicial – penal. *Revista Toxicodependências* 14, 1:7-16.

Simmonds, P., Holmes, E.C., Cha, T.A., Chan, S.W., McOmish, F., Irvine, B., Beall, E., Yap, P.L., Kolberg, J. e Urdea, M.S. 1993. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *Journal of General Virology* 74:2391-2399.

Simmonds, P., Smith, D.B., McOmish, F., Yap, P.L., Kolberg, J., Urdea, M.S. e Holmes, E.C. 1994. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *Journal of General Virology* 75:1053-1061.

Simmonds, P. 1999. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *Journal of Hepatology* 31: 54-60.

Simmonds, P. 2001. Reconstructing the origins of human hepatitis viruses. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 356:1013-1026.

Simmonds, P. 2004. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 years on. *Journal of General Virology* 85:3173-3188.

Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deléage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspé, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D.G., Okamoto, H., Pawlotsky, J.M., Penin, F., Sablon, E., Shin-I, T., Stuyver, L.J., Thiel, H.J., Viazov, S., Weiner, A.J. e Widell, A. 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42:962-793.

Smith, D.B., Pathirana, S., Davidson, F., Lawlor, E., Power, J., Yap, P.L. e Simmonds, P. 1997. The origin of hepatitis C virus genotypes. *Journal of General Virology* 78:321-328.

Suzuki, T., Ishii, K., Aizaki, H. e Wakita, T. 2007. Hepatitis C viral life cycle. *Advanced drug delivery reviews* 59:1200-1212.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. e Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599. Disponível em: <http://www.megasoftware.net/>.

Thomas, D.L., Astemborski, J., Rai, R.M., Anania, F.A., Schaeffer, M., Galai, N., Nolt, K., Nelson, K.E., Strathdee, S.A., Johnson, L., Laeyendecker, O., Boitnott, J., Wilson, L.E. e Vlahov, D. 2000. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *The Journal Of the American Medical Association* 284:450-456.

Timm, J., Neukamm, M., Kuntzen, T., Kim, A.Y., Chung, R.T., Brander, C., Lauer, G.M., Walker, B.D. e Allen, T.M. 2007. Characterization of full-length hepatitis C virus genotype 4 sequences. *Journal of Viral Hepatitis* 14:330-337.

Timm, J. e Roggendorf, M. 2007. Sequence diversity of hepatitis C virus: implications for immune control and therapy. *World Journal of Gastroenterology* 13:4808-4817.

Vassilaki, N. e Mavromara, P. 2009. The HCV ARFP/F/core+1 protein: production and functional analysis of an unconventional viral product. *IUBMB Life* 61:739-752.

de Waure, C., Cefalo, C., Chiaradia, G., Sferrazza, A., Miele, L., Gasbarrini, G., Ricciardi, W., Grieco, A. e La Torre, G. 2009. Intrafamilial Transmission of Hepatitis C Virus in Italy: A Systematic Review. *Journal of Epidemiology and Community Health* (In press).

World Health Organization. 1997. Hepatitis C- global prevalence. *Weekly Epidemiological Record* 72:341.

World Health Organization. 1999. Hepatitis C- global prevalence. *Weekly Epidemiological Record* 49:425-427.

Yukse, K., Chen, W.L., Chien, D. e Ou, J.H. 2009. Ubiquitin-independent degradation of hepatitis C virus F protein. *Journal of Virology* 83:612-621.

Websites consultados:

<http://hcv.lanl.gov/content/sequence/HCV/classification/genotable.html> (acedido em 18.09.09).

<http://www.ictvonline.org/virus> (acedido em 15.09.09).

<http://hcv.lanl.gov/cgi-bin/LOCATE/locate.cgi> (acedido em 15.09.09)

<http://www.generunner.net/> (acedido em 15.09.09)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (acedido em 15.09.09).

<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/software/> (acedido em 15.09.09).

<http://www.hcvdb.org> (acedido em 15.09.09).

Anexo I – Consentimento informado relativo à participação no presente estudo.

Unidade de Virologia
Instituto de Higiene e Medicina Tropical
Universidade Nova de Lisboa

CONSENTIMENTO INFORMADO

relativo à participação num estudo de caracterização genética de estirpes de HIV e HCV circulantes entre
toxicodependentes em Portugal

Informação prévia

O vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) é o agente etiológico responsável pelo síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). O vírus da hepatite C (HCV) é uma das principais causas de hepatite crónica, cirrose do fígado e carcinoma hepatocelular a nível mundial. O estudo em questão resulta de uma colaboração entre o Centro das Taipas e a Unidade de Virologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical e tem como objectivos principais:

- ✓ determinar algumas das características genéticas dos vírus HIV e HCV infectantes, nomeadamente o seu subtipo;
- ✓ identificar a presença de mutações associadas a resistência aos fármacos usados na terapêutica de infecções por HIV.

Vantagens da participação neste estudo

A sua participação neste estudo contribuirá para um melhor conhecimento das estirpes HIV circulantes entre toxicodependentes. Os dados obtidos poderão contribuir para a:

- ✓ adequação de estratégias terapêuticas;
- ✓ melhor caracterização epidemiológica da infecção por HIV e HCV em Portugal;
- ✓ planificação de possíveis vacinas.

Confidencialidade

Ao aceitar participar neste estudo declaro que me foi comunicado pelo pessoal de saúde envolvido que será **mantida toda a confidencialidade e não será quebrado o respeito pela minha privacidade**. Ao participar neste estudo, declaro que me foram dadas informações suficientes relativas ao mesmo. A minha participação garante-me, ainda, o direito de colocar as perguntas que achar convenientes e de obter informação adicional relacionada com o estudo em questão.

Assinatura:

Local e Data:

Anexo II – Inquérito epidemiológico fornecido juntamente com a colheita de amostras.

Caracterização genética de estirpes de VIH-1 e HCV circulantes numa população de toxicodependentes em Portugal

Nº de Identificação

1. Serologia positiva para:

VIH-1

VIH-2

HCV

2. Sexo:

Masculino

Feminino

3. Idade:

4. País de origem:

5. Escolaridade:

8. Profissão:

8. Ausências do País

Sim

Onde?

Não

9. Estadio evolutivo da infecção VIH-1:

Fase assintomática

Fase sintomática

10. Terapêutica de substituição

Metadona

Buprenorfina

11. Terapêutica anti-retroviral

Sim

Não

12. Relações sexuais não protegidas

Sim

Não

13. Nacionalidade do(a) parceiro(a)

14. Partilha de seringas

Sim

Não

Anexo III – Dados epidemiológicos, serológicos e virológicos referentes às 135 amostras colhidas para este estudo, pertencentes a uma população frequentadora do centro de atendimento a toxicodependentes das TAIPAS. ID- Identificação da amostra, M- Masculino, F- Feminino, PT- Portugal, (+) positivo, (-)negativo, S- Sim, N- Não, S/inf – Sem informação, n.r. – Não Responde, * - infecção com VIH-1; Nacionalidade: PT-Portugal, BR-Brasil, CV – Cabo Verde, MC-Moçambique, FR- França, EL- Eslovénia, AG-Angola, AFs-África do Sul.

ID	Género	Idade	Nacionalidade	Partilha material Injecção	Relações sexuais não protegidas	Serologia anti-VHC	Detecção	RNA-VHC
							5'UTR	NS5B+C/E1
2*	F	42	PT	S	N	+	+	+
3*	M	39	PT	S	S	+	+	+
4*	M	42	PT	S	S	+	+	+
8*	F	37	PT	N	S	+	+	+
10	M	34	PT	S	N	+	+	+
11	M	33	PT	N	n.r.	+	+	+
12	F	42	PT	S	N	+	+	+
13*	M	40	PT	N	N	+	+	+
14	M	39	PT	S	n.r.	+	+	+
15	F	37	EL	S	n.r.	+	+	+
16*	M	38	PT	S	S	+	+	+
17	M	41	PT	S	N	+	+	+
20	M	50	PT	N	S	+	+	+
21	M	30	AG	S	S	+	+	+
23	M	43	PT	S	S	+	+	+
24*	M	38	PT	N	N	+	+	+
27	M	48	PT	S	N	+	+	+
28	F	32	PT	N	N	+	+	+
31	M	30	PT	N	S	+	+	+
34	M	43	PT	N	N	+	+	+
36	M	43	PT	S	S	+	+	+
37	F	43	PT	S	S	+	+	+
38*	M	36	PT	N	N	+	+	+
40	M	49	PT	N	N	+	+	+
42*	M	44	PT	N	S	+	+	+
44*	M	55	PT	S	S	+	+	+
50	M	56	PT	S	S	+	+	+
53	F	34	PT	S	S	+	+	+
56	M	31	PT	S	S	+	+	+
57	M	29	PT	N	S	+	+	+
58	F	35	FR	N	S	+	+	+
61	M	38	PT	N	S	+	+	+
70	M	44	PT	S	S	+	+	+
72*	F	44	PT	N	S	+	+	+
73	M	33	PT	N	S	+	+	+
76	M	41	PT	N	S	+	+	+
77	M	38	PT	N	S	+	+	+
78	F	29	PT	N	S	+	+	+
81	M	39	PT	N	S	+	+	+
83	M	48	PT	N	S	+	+	+
84	M	40	PT	N	S	+	+	+

85*	M	32	AG	S	S	+	+	+
86	M	28	PT	N	S	+	+	+
87	M	31	PT	N	S	+	+	+
88	M	45	PT	S	S	+	+	+
90	M	51	AG	N	S	+	+	+
93	M	35	PT	N	S	+	+	+
94	M	41	AFs	N	S	+	+	+
96	F	48	PT	N	S	+	+	+
98*	M	47	PT	S	S	+	+	+
100	M	37	PT	N	S	+	+	+
105	M	45	PT	N	S	+	+	+
106	M	21	PT	N	S	+	+	+
107*	F	31	PT	N	S	+	+	+
112	M	36	FR	S	S	+	+	+
114*	M	38	PT	N	S	+	+	+
116	M	32	PT	N	S	+	+	+
117	M	34	PT	S	S	+	+	+
118	M	45	PT	S	S	+	+	+
119	M	37	PT	N	S	+	+	+
121	M	43	PT	S	S	+	+	+
122	M	45	PT	N	S	+	+	+
123	M	53	PT	S	S	+	+	+
124	M	51	PT	N	S	+	+	+
126	M	42	MC	N	S	+	+	+
127	M	33	PT	N	S	+	+	+
134	M	36	PT	S	S	+	+	+
1	F	44	PT	S	S	+	-	s/inf.
5	M	42	PT	S	S	+	-	s/inf.
6	F	37	PT	S	N	+	-	s/inf.
7	M	32	PT	S	S	+	-	s/inf.
9	M	33	PT	S	S	+	-	s/inf.
18	M	38	PT	S	n.r.	+	-	s/inf.
22	F	36	PT	S	n.r.	+	-	s/inf.
33	M	54	PT	N	N	+	-	s/inf.
60	F	48	PT	N	S	+	-	s/inf.
66	M	41	PT	S	S	+	-	s/inf.
74	F	39	PT	S	S	+	-	s/inf.
109	M	40	PT	N	S	+	-	s/inf.
110	F	46	PT	N	S	+	-	s/inf.
125*	M	52	PT	N	S	+	-	s/inf.
130*	F	51	PT	S	S	+	-	s/inf.
19*	F	41	CV	N	N	-	s/inf.	s/inf.
29	F	34	PT	N	N	-	s/inf.	s/inf.
30	M	28	PT	N	N	-	s/inf.	s/inf.
35	M	27	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
39	F	22	PT	N	N	-	s/inf.	s/inf.
41	M	22	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
43	F	28	PT	N	N	-	s/inf.	s/inf.
45	M	33	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
46	M	25	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
47*	F	33	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.

48	M	31	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
49	M	28	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
51	F	33	MC	N	N	-	s/inf.	s/inf.
52	M	42	PT	N	N	-	s/inf.	s/inf.
54	M	24	CV	N	S	-	s/inf.	s/inf.
55*	F	37	PT	S	S	-	s/inf.	s/inf.
59	M	31	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
62	M	45	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
63*	M	42	AG	N	S	-	s/inf.	s/inf.
64	M	40	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
65	F	23	PT	N	N	-	s/inf.	s/inf.
67	M	33	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
68	M	34	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
71*	F	46	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
75	M	33	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
79	M	55	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
80	F	32	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
82	F	23	PT	N	n.r.	-	s/inf.	s/inf.
91	M	34	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
92	M	34	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
95	M	29	PT	N	N	-	s/inf.	s/inf.
97	M	29	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
99	M	27	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
101	F	57	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
102	M	43	CV	N	S	-	s/inf.	s/inf.
103	F	17	PT	N	N	-	s/inf.	s/inf.
108	M	48	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
111	M	37	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
113	M	58	PT	N	N	-	s/inf.	s/inf.
115	M	35	MC	N	S	-	s/inf.	s/inf.
120	F	36	BS	N	S	-	s/inf.	s/inf.
128*	F	53	AG	N	S	-	s/inf.	s/inf.
129	M	41	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
131	F	35	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
132	F	23	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
133	M	26	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
135	M	28	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
136	M	39	AG	N	S	-	s/inf.	s/inf.
137	M	40	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
138	F	23	PT	N	N	-	s/inf.	s/inf.
139	M	29	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.
140	M	30	PT	N	N	-	s/inf.	s/inf.
141	M	28	PT	N	S	-	s/inf.	s/inf.

